



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

CURSO DE ESPECIALIDAD EN GINECOLOGÍA ONCOLÓGICA

**FACTORES EPIGENÉTICOS QUE CONTROLAN LAS VÍAS DE *BRCA1/2* Y
SU ASOCIACIÓN COMO MARCADORES POTENCIALES DE *BRCANESS*
EN LA RESPUESTA A LA QUIMIOTERAPIA NEOADYUVANTE
CONVENCIONAL EN EL CANCER DE MAMA TRIPLE NEGATIVO
LOCALMENTE AVANZADO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

SUBESPECIALISTA EN GINECOLOGÍA ONCOLÓGICA

PRESENTA:

DR JAVIER CÉSAR MEJÍA GÓMEZ

ASESOR DE TESIS:

**DR ENRIQUE BARGALLÓ ROCHA
JEFE DEL SERVICIO DE TUMORES MAMARIOS**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

I. SÍNTESIS DE PROYECTO.....	(3)
1) Antecedentes.....	(3)
2) Objetivo.....	(4)
3) Hipótesis de investigación.....	(4)
II. MARCO TEÓRICO.....	(4)
1) Antecedentes del cáncer de mama.....	(4)
a. Cáncer de mama triple negativo.....	(5)
b. Subtipos del cáncer de mama triple negativo.....	(6)
c. Sales Platinadas en el tratamiento del cáncer de mama.....	(8)
2) Estructura y función de BRCA.....	(9)
a. Estructura de BRCA1.....	(9)
b. Estructura de BRCA2.....	(9)
c. Funciones de BRCA1/2.....	(10)
3) Importancia clínica de las anomalías de BRCA.....	(12)
a. Mutaciones.....	(12)
b. BRCAness en el cáncer de mama.....	(12)
i. BRCAness y los procesos epigenéticos.....	(13)
ii. Metilación del promotor como mecanismo de silenciamiento proteico.....	(13)
iii. Reducción de la abundancia proteica de BRCA1.....	(15)
4) Terapias blanco en el cáncer de mama triple negativo BRCAness positivo.....	(15)
a. El papel del PARP en el cáncer de mama triple negativo.....	(15)
III. HIPÓTESIS DEL PROYECTO.....	(16)
IV. DISEÑO DEL ESTUDIO.....	(17)
V. GRUPOS DE ESTUDIO.....	(17)
VI. TAMAÑO MUESTRAL.....	(17)
VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	(17)
1) Criterios de inclusión.....	(18)
2) Criterios de exclusión.....	(18)
3) Criterios de eliminación.....	(18)
4) Análisis de variables.....	(18)
5) Período de realización del proyecto de investigación.....	(18)
VIII. OBJETIVOS.....	(18)
1) Objetivo Primario.....	(18)
2) Objetivos Secundarios.....	(18)
IX JUSTIFICACIÓN.....	(19)
X MATERIALES Y MÉTODOS.....	(19)
1) Selección de Pacientes.....	(19)
2) Obtención de tejido tumoral, extracción de proteínas, DNA, RNA.....	(19)
3) Análisis de mutaciones somáticas y germinales de BRCA 1/2.	(19)
4) RT-qPCR.....	(20)
5) Metilación del promotor de BRCA1.....	(20)
XI RESULTADOS.....	(21)
XII DISCUSIÓN.....	(23)
XIII CONCLUSIONES.....	(26)
XIV REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	(26)

I. SÍNTESIS DEL PROYECTO

1) Antecedentes: Las mutaciones en los genes *breast cancer 1* y *2* (*BRCA1/BRCA2*) predisponen al desarrollo de cáncer, principalmente a través de la pérdida de capacidad de reparación de las rupturas de doble cadena del ADN (RDC-ADN). Estos genes juegan un papel clave en el proceso de recombinación homóloga (RH), el cual es un mecanismo de reparación libre de errores, del ADN. Cuando los genes de *BRCA1/2* se encuentran mutados, ocurre la activación de mecanismos alternativos de reparación (propensos a errores), favoreciéndose la inestabilidad genómica. Las mutaciones somáticas ocurren con poca frecuencia en el cáncer de mama esporádico,^{1,2} sin embargo la expresión de los genes *BRCA1/2* puede encontrarse sub-regulada de formas diversas, resultando en una represión fenotípica.³ Un fenómeno que se conoce como “BRCAness” ha sido descrito en pacientes con cáncer de mama esporádico que carecen de mutaciones germinales en *BRCA1/2*. En estos pacientes, los tumores son fenotípicamente similares a aquellos con mutaciones germinales, ya que manifiestan una inactivación funcional de *BRCA1/2* sin ser portadores de mutaciones constitutivas, y podrían tener una susceptibilidad al tratamiento análoga a las pacientes con mutaciones germinales.

Las mujeres con mutaciones germinales de *BRCA* son más propensas a desarrollar cáncer de mama, ovario, y otros tipos de tumores debido a la incapacidad de reparar efectivamente el daño al ADN. Estas mutaciones son las responsables del 10% de los casos de cáncer de mama, sin embargo estudios recientes⁴ han demostrado que este grupo de pacientes responden mejor cuando son tratados con quimioterapia que daña directamente el ADN. Por otra parte, se ha demostrado la existencia de un grupo de tumores no mutados que poseen asimismo un defecto en la reparación del ADN o “BRCAness” el cual es un fenómeno ocasionado por la metilación del promotor de *BRCA1/2*, sub-expresión del gen *BRCA1*, así como otros mecanismos epigenéticos;⁵ este grupo tumoral se comporta de una manera similar a aquellos con una mutación germinal. Existe evidencia clínica que apoya el uso de agentes quimioterapéuticos que dañan el ADN en tumores con BRCAness. En la actualidad no existe una prueba de laboratorio estandarizada que pueda detectar la existencia de BRCAness; no obstante varios tipos de técnicas están siendo desarrolladas con la finalidad de personalizar la quimioterapia administrada en las pacientes con cáncer de mama. Recientemente ha sido demostrado que > 60% de las pacientes con Cáncer de Mama Triple Negativo (CMTN) son portadoras de tumores BRCAness positivos.⁶

Aproximadamente una quinta parte de los casos de CMTN progresan durante la Quimioterapia Neoadyuvante (QT-NEO), especialmente aquellos tratados con Taxanos. Añadir sales platinadas a la QT-NEO significativamente mejora la tasa de Respuesta Patológica Completa (RPC) en pacientes con CMTN. No obstante, aún es controversial si la quimioterapia basada en platino debe ser añadida, o sustituir a la quimioterapia convencional. La mayoría de las pacientes con CMTN BRCAness-negativos logran una RPC mediante el uso de QT estándar; sin embargo las pacientes con CMTN que presentan el fenotipo BRCAness son más propensas a desarrollar progresión de la enfermedad y es precisamente este grupo el de peor pronóstico.⁶ Recientemente se ha demostrado que la terapia adyuvante de alta dosis basada en Platino tiene una mayor efectividad que la quimioterapia convencional en el tratamiento de tumores BRCAness positivos, no siendo así para los tumores BRCAness-negativos. Consecuentemente, para hacer más eficiente la terapia y disminuir sus efectos secundarios, el uso de sales platinadas en el tratamiento de CMTN deberá realizarse basándose en el estado de BRCAness tumoral antes que añadirlas de una manera generalizada al tratamiento de todas las pacientes con CMTN. Diferentes trabajos demostraron que las pacientes portadoras de

mutaciones germinales de *BRCA1/2* son sensibles a inhibidores de las proteínas PARP, encargadas de la reparación de las rupturas de cadena simple de ADN por medio del mecanismo de reparación de escisión de bases. La inhibición del PARP resulta en la deficiencia de la reparación de rupturas de cadena simple, evento que favorece la aparición de rupturas de doble cadena que no pueden ser reparadas. En el futuro, la determinación del estado de BRCAness en el CMTN será una valiosa herramienta en la selección de pacientes candidatas a terapia con inhibidores del PARP.

2) **Objetivo:** Investigar si la presencia de BRCAness puede predecir la respuesta al tratamiento con QT-NEO basada en Antraciclina y Taxanos en pacientes con CMTN localmente avanzado. Nuestro reto es encontrar la correlación entre un perfil molecular específico y la respuesta clínica de las pacientes con CMTN. El propósito de nuestro estudio es el analizar el papel que juegan los principales mecanismos epigenéticos, tales como la presencia de proteína de *BRCA1/2*, el nivel de expresión de los genes de *BRCA1/2* y el estatus de metilación del promotor del gen *BRCA1/2*, en el cáncer de mama TN y su asociación con el fenómeno de BRCAness.

3) **Hipótesis de investigación:** La hipermetilación del DNA en el promotor del gen *BRCA1*, así como la sub-expresión *BRCA1/2*, conlleva a la disminución de la expresión de estos genes, contribuyendo al fenotipo BRCAness en pacientes con cáncer de mama triple negativo. La presencia de BRCAness en pacientes con CMTN se asociará a una respuesta diferencial al tratamiento con Antraciclina y Taxanos, mostrando una menor respuesta patológica completa y una recurrencia más pronta que los pacientes con tumores BRCAness negativos.

II. MARCO TEÓRICO

1) Antecedentes del cáncer de mama.

El cáncer de mama es una enfermedad heterogénea con diferentes características clinicopatológicas, tipos de respuesta al tratamiento, y pronóstico. El perfeccionamiento alcanzado en el desarrollo de terapias blanco (anticuerpos monoclonales dirigidos contra HER-2/neu) ha ocasionado una diferencia substancial tanto en la respuesta como en la sobrevida. A pesar de los avances clínicos significativos cada año mueren por cáncer de mama 521,907 mujeres en el mundo,⁷ y aproximadamente 40,730 en EUA.⁸ Por lo tanto existe una necesidad imperativa de encontrar estrategias terapéuticas alternativas.

La clasificación del cáncer de mama se realiza en base a sus características histopatológicas, así como las particularidades inmunohistoquímicas de los receptores hormonales (RE, RP) y HER2/neu. No obstante las características histopatológicas e inmunohistoquímicas no son suficientes para entender la heterogeneidad del cáncer de mama. La clasificación molecular del cáncer de mama tiene como objetivo simplificar la heterogeneidad de esta enfermedad, mediante el uso de un abordaje genómico; se recomienda identificar el fenotipo molecular porque favorece el avance en la identificación de biomarcadores y subgrupos de pacientes en la búsqueda de terapias blanco, para acercarse cada vez más a la práctica clínica ideal de la medicina personalizada.⁹ La clasificación molecular del cáncer de mama (Tabla 1) mediante el uso de microarreglos de ADN, nos permite distinguir seis subtipos: luminal A, luminal B, sobreexpresión de HER-2, fenotipo basal, normal *breast-like* y *claudin-low*¹⁰⁻¹² los cuales difieren en incidencia, respuesta a la terapia así como sobrevida.¹³

SUBTIPO	APROXIMACIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA	%
Luminal A	RE+ / RP+ / HER2 NEG / Ki67 < 14%	40
Luminal B (HER-2 POSTIVO)	RE+ / RP CUALQUIER VALOR / HER2 POS / CUALQUIER Ki67	20
Luminal B (HER-2 NEGATIVO)	RE+ / RP – (ó bajo) / HER2 NEG / Ki67 > 14%	
HER-2 Sobreexpresado	RE- / RP- / HER2 POS	10 - 15
Basal	RE- / RP- / HER2 NEG / Ki67 > 14% / EGFR+ / CK5+ / CK6+	15 - 20

Normal <i>breast-like</i>	RE- / RP+ / HER2+	3 - 5
Claudin low	RE- / Subexpresión de las proteínas de unión estrecha (Claudin 3, 4 y 7) / E-cadherina baja.	12 - 14

Tabla 1. Subtipos moleculares del cáncer de mama y porcentaje de presentación.

a. Cáncer de mama triple negativo

El CMTN comprende del 15-20% del cáncer invasivo de mama, se caracteriza por ser biológicamente agresivo, carece de una terapia estandarizada, ausencia de expresión de *BCL2*, contenido elevado de *P53* y un alto grado histológico.¹⁴ Alrededor de un 10-20 % de las pacientes con CMTN tienen mutación de *BRCA1* mientras que la mutación de *BRCA2* es menos común. Debido a esta alta tasa mutacional, las guías de la NCCN 2015 recomiendan que las pacientes con CMTN diagnosticadas a una edad de ≤ 60 años, sean valoradas por un Genetista para descartar mutación de *BRCA1/2* sin importar la historia familiar ni raza.¹⁵ No se deben considerar sinónimos el carcinoma triple negativo y el *basal-like*, ya que solo 49% a 71% de los CMTN son *basal-like*, y el 77% de los *basal-like* son triples negativos.¹⁶ El estándar de oro para el diagnóstico de carcinomas *basal-like* es el perfil de expresión genética, identificación por IHQ de RE, HER-2, EGFR y CK 5/6+, los cuales tienen sensibilidad y especificidad variables.¹⁷

El CMTN incluye diversos fenotipos histológicos así como perfiles moleculares, con diferentes tipos de respuesta al tratamiento.¹⁸ Aproximadamente 33% de las pacientes con CMTN de alto grado, responderán adecuadamente a la QT-NEO basada en Antraciclinas y Taxanos y alcanzarán una RPC; la cual se ha reportado como un marcador subrogado de la Sobrevida Global de pacientes con CMTN.^{19, 20} Sin embargo, aproximadamente 20% de las pacientes con CMTN desarrollarán progresión durante la QT-NEO, especialmente aquellas pacientes tratadas con Taxanos; siendo este un grupo de mal pronóstico.^{21, 22} En la actualidad no existen estudios efectivos de diagnóstico (imagen, inmunohistoquímica, e histológicos) que permitan distinguir entre los grupos de CMTN resistentes y los sensibles al tratamiento quimioterapéutico.

Las pacientes con CMTN tienen un mayor riesgo de recurrencia local y a distancia, las metástasis ocurren con más frecuencia en cerebro y pulmones. La gran mayoría de las metástasis del CMTN ocurren en los primeros 3 años posteriores al diagnóstico, y aquellas pacientes que no han recurrido aún durante este período tienen una tasa de sobrevida similar en comparación con las pacientes con cáncer de mama con RE-positivos.²³

Estudios aleatorizados recientes han demostrado que el añadir Carboplatino a la QT-NEO basada en Antraciclinas y Taxanos mejora la tasa de RPC en pacientes con CMTN.^{24, 25} Existen 2 meta-análisis publicados, los cuales encontraron efectos similares en la tasa de RPC al agregar agentes platinados a la QT-NEO.^{26, 27} No obstante, el añadir Carboplatino a QT-NEO estándar aumenta el índice de efectos adversos, lo cual lleva a un incremento en la tasa de abandono al tratamiento así como modificación de las dosis. Aún no está claro si el uso de Carboplatino se deba añadir, o substituir a la QT-NEO estándar en el CMTN; es por esto que es necesario el desarrollo de marcadores biológicos que puedan predecir la respuesta a la QT-NEO estándar.

Las rupturas de cadena doble de ADN (RCD-ADN) son reparadas mediante el mecanismo de recombinación homóloga, regulado por *BRCA1/2* así como por la unión de extremos no homólogos.²⁸ Las rupturas de cadena simple son reparadas mediante el mecanismo de reparación de escisión de bases, el cual es regulado por poli-ADP ribosa polimerasa (PARP) 1 así como por vías de reparación mediante escisión de nucleótidos. Por consiguiente, los tumores con mutación de *BRCA* no tienen la capacidad de reparar las RCD-ADN que son inducidas por agentes quimioterapéuticos tales como: alquilantes bifuncionales y sales platinadas. Los tumores con *BRCA1/2* deficientes, son hipersensibles a las terapias inductoras de RCD-ADN y probablemente también a los inhibidores del PARP.^{4, 29-31}

Se ha confirmado la existencia de un grupo tumoral que no tiene mutaciones en los genes de *BRCA1/2* y que posee defectos en la vía de reparación del ADN por recombinación homóloga; este grupo se comporta de una manera similar a aquellos con una mutación documentada. Este fenómeno se conoce como el fenotipo BRCAness.^{4, 5} En la actualidad no existe una prueba de laboratorio estandarizada que pueda detectar la existencia de BRCAness; no obstante varios tipos de técnicas están siendo desarrolladas con la finalidad de personalizar la quimioterapia administrada en las pacientes con CMTN. La valoración del estado de BRCAness ha sido descrita recientemente mediante el uso de Hibridación Genómica Comparativa en array (aCGH) ó mediante la Amplificación de Sondas Dependientes de Ligandos Múltiples (MLPA).³² Las pacientes con tumores BRCAness tienen una sobrevida global más prolongada cuando son tratadas con agentes alquilantes en la adyuvancia.³² Aunque las mutaciones germinales en *BRCA1/2* han sido asociadas con $\leq 15\%$ de CMTN.^{33, 34} La tasa reportada de BRCAness en pacientes con CMTN, mediante las técnicas de aCGH y MLPA, es de 66 – 69%, en comparación con 18% cuando se toman en cuenta todos los subtipos de cáncer de mama.^{29, 35, 36} Por lo tanto es probable que el la valoración del estado de BRCAness sea útil únicamente en aquellas pacientes con CMTN. El número de pacientes que logren beneficiarse de un régimen de quimioterapia personalizada (basada en Platino) y/o inhibidores del PARP puede ser mayor valorando el estado de BRCAness en lugar del estado mutacional de *BRCA1/2* únicamente.

Estudios preclínicos y clínicos emergentes, han demostrado que los tumores asociados con deficiencia de *BRCA* tienden a ser resistentes a la quimioterapia basada en Taxanos.^{33, 34} Los tumores mamarios de ratones portadores de mutación de *BRCA* son resistentes a la Doxorrubicina y Docetaxel pero no demuestran resistencia al Cisplatino.³³ Un estudio in vitro demostró la presencia de resistencia al Taxano en una línea celular de cáncer de mama con *BRCA* mutado.¹⁸

b) Subtipos del cáncer de mama triple negativo

El CMTN es una enfermedad clínicamente, patológicamente y molecularmente heterogénea. Lehmann y colaboradores identificaron seis diferentes subtipos de CMTN, mediante el análisis de expresión genética de 386 casos; cada uno de ellos demostrando características biológicas únicas.¹⁸ Es de vital importancia buscar nuevas dianas terapéuticas para el tratamiento de cada uno de estos subtipos, ya que menos del 30% de las pacientes con CMTN metastásico tienen una sobrevida mayor o igual a 5 años. La sobrevida media de las pacientes con CMTN metastásico es de 13 meses, y prácticamente todas las pacientes con CMTN metastásico mueren de su enfermedad a pesar del tratamiento sistémico.³⁷ A la fecha no existe terapia blanco para el tratamiento del CMTN y la quimioterapia sistémica sigue siendo el estándar de tratamiento.

A pesar que los términos Triple Negativo y Tipo Basal (Basal Like) no son sinónimos, aproximadamente 80% del CMTN (RE/RP/HER2 negativo) se clasifican como Tipo Basal. Los seis subtipos de CMTN incluyen: dos Tipos Basales (BL1 y BL2), un tipo Inmunomodulador, un Mesenquimal (M), así como un tipo Células Madre Mesenquimales (MSL), y finalmente un subtipo Receptor de Andrógeno Luminal (LAR) este último se caracteriza por la presencia de receptores de andrógeno.¹⁸

Recientemente en un trabajo publicado por el grupo de Masuda y colaboradores, realizó un análisis retrospectivo de 130 pacientes con CMTN tratadas con QT/NEO basada en Adriamicina/Taxol.³⁸ La tasa de RPC fue del 28% sin embargo esta tasa demostró una variación significativa respecto al subtipo de CMTN. Se encontró hasta 52% de RPC para BL1; sin embargo los subtipos BL2, LAR y MSL tuvieron la tasa de RPC más baja (0%, 10% y 23%, respectivamente). Estos hallazgos, así como futuros estudios prospectivos, deberán servir como guías en la selección del tratamiento quimioterapéutico de pacientes con CMTN en un afán de encontrar terapias blanco efectivas.

Liedtke y colaboradores establecieron que aquellas pacientes con cáncer de mama que logren alcanzar una RPC (ausencia de enfermedad residual en mama y axila) posterior al tratamiento con QT/NEO tienen un buen resultado a largo plazo.³⁹ Por el contrario, una alta carga tumoral residual (CTR) encontrada en la pieza quirúrgica y posterior al tratamiento ha demostrado una elevada correlación con recurrencia y muerte.^{40, 41} De manera más específica, al menos 40% de las pacientes con CMTN que no logran alcanzar una RPC post QT/NEO basada en Antraciclinas y Taxanos tendrán una recurrencia en los siguientes 36 meses.²⁰ Sin embargo, aproximadamente 30% del CMTN tratado con QT basada en Antraciclinas y Taxanos tendrá una RPC posterior al tratamiento; el lograr una RPC al tratamiento con QT/NEO en este grupo de pacientes ha demostrado ser un fuerte factor pronóstico positivo. Las pacientes con CMTN quienes completan QT/NEO y carecen de evidencia clínica de enfermedad metastásica posterior al tratamiento quirúrgico, sin importar la CTR usualmente se dejan en vigilancia sin algún tipo de tratamiento adyuvante. Esta conducta puede que no sea apropiada para las pacientes que se encuentran en un riesgo muy elevado de recurrencia temprana tales como aquellas con una alta CTR quimio-resistente. Sin embargo, el tratamiento apropiado para aquellas pacientes es aún desconocido, y las estrategias terapéuticas individualizadas utilizando quimioterapia neoadyuvante molecularmente dirigida a dianas tumorales específicas se requieren con urgencia.

SUBTIPOS DE CÁNCER DE MAMA			
SUBTIPO	CARACTERÍSTICAS	TB POTENCIALES	TASA DE RPC³⁸
BASAL LIKE 1	Ciclo Celular Elevado. Expresión de genes de respuesta de daño al ADN.	Platino Inhibidores del PARP	0.52
BASAL LIKE 2	Enriquecido en señalización de factores de crecimiento así como genes mioepiteliales.	Inhibidores de mTOR	0
INMUNOMODULADOR	Compuesto por antígenos inmunes y genes involucrados en las vías inmunes centrales y de citoquina, de señalización y transducción. Infiltrado linfocitario tumoral.	Inhibidores de PD-1 / PDL-2	0.3
MESENQUIMAL	Expresión elevada de genes involucrados en la transición epitelial-mesenquimal y vías de factor de crecimiento.	Inhibidores de Tirosin-quinasa (dasatinib) / mTOR	0.31
CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES	Expresión elevada de genes involucrados en la transición epitelial-mesenquimal y vías de factor de crecimiento. Expresión disminuida de genes involucrados en la proliferación.	Inhibidores de PI3K / mTOR	0.23
RECEPTOR DE ANDRÓGENO LUMINAL	Expresión genética luminal Activado por el Receptor de Andrógeno (RA). Crecimiento lento.	Antagonistas de RA (bicalutamida) Inhibidores de PI3K	0.1

Tabla 2. TB: TERAPIA BLANCO, RPC: RESPUESTA PATOLOGICA COMPLETA AL TRATAMIENTO CON QT/NEO CONVENCIONAL BASADA EN ANTRACICLINAS Y TAXANOS

El grupo de Burstein y colaboradores⁴² han subclasificado al CMTN mediante un análisis transcripcional con un menor número de pacientes (N: 84), en comparación con el utilizado por Lehmann. La clasificación del Baylor College of Medicine del CMTN, los divide en cuatro grupos: Receptor de Andrógeno Luminal (LAR), Mesenquimal (MES), Tipo Basal Inmuno-Suprimido (BLIS), Tipo Basal Inmuno-Activado (BLIA). De manera similar al estudio publicado por Lehmann, las pacientes con CMTN con tumores que expresan características de componente inmune tuvieron el mejor resultado. Al comparar los dos estudios existe una evidente correlación entre los subtipos: MSL y MES, IM y BL1 con BLIA, M con BLIS y los dos subtipos LAR. El grupo Francés encabezado por Jezequel y colaboradores,⁴³ publicaron la subclasificación del CMTN más reciente (N: 107) y la dividieron en tres diferentes tipos: C1, C2 y C3 los cuales se correlacionan con los subtipos propuestos por Lehmann y Burstein.

ESTUDIOS QUE AVALAN LA SUBCLASIFICACIÓN DEL CMTN		
JEZEQUEL N=107	LEHMANN N=386	BURSTEIN N=84
C1	LAR	LAR
C2	BL1 / M	BLIS
C3	IM	BLIA
	MSL	MES
	BL2	

Tabla 3. Estudios que avalan la subclasificación del CMTN

La identificación de los diferentes subtipos del CMTN, caracterizados por diversas vías biológicas así como diferentes tipos de respuesta a la quimioterapia sistémica es fundamental para lograr la administración de un tratamiento personalizado en el CMTN. En conclusión, los datos presentados respecto a la subclasificación del CMTN demuestran que:

- A) Existen al menos de 3 a 6 subtipos de CMTN.
- B) Los subtipos transcripcionales son reproducibles.
- C) Los subtipos del CMTN muestran diferentes tasas de respuesta a la QT/NEO estándar.
- D) El CMTN con RA (+) tiene una mala respuesta a la QT/NEO estándar y potencialmente son sensibles a los inhibidores de PI3K.
- E) A medida que se aumente la cantidad de pacientes analizados en la muestra, así aumentará la cantidad de subtipos encontrados.

Basándonos en estos resultados, postulamos que es completamente inapropiado tratar de manera uniforme a todas las pacientes con CMTN.

c) Uso de Sales Platinadas en el cáncer de mama

Las sales platinadas incluyen Carboplatino y Cisplatino, estas ejercen su mecanismo de acción ocasionando rupturas de doble cadena del DNA, las cuales pueden ser especialmente importantes en células con deficiencia en el mecanismo de la RH tales como células con BRCA mutado y CMTN. Poniendo este concepto en la práctica clínica, Rocca y colaboradores⁴⁴ realizaron un estudio retrospectivo en donde se analizaron biopsias trucut de pacientes con cáncer de mama tratadas con quimioterapia neoadyuvante basada en cisplatino y demostraron que la administración del Cisplatino sin Antraciclinas brindó una mayor tasa de RPC en pacientes con tumores p63 positivos.

Recientemente, evidencia sólida ha sido publicada respecto a la actividad del Platino en el CMTN, esta evidencia fue presentada en dos grandes estudios aleatorizados fase II en pacientes tratadas con QT/NEO: el estudio GeparSixto,²⁴ en el subgrupo de pacientes con CMTN, se comparó el Paclitaxel neoadyuvante, Doxirrubicina, y Bevacizumab con (159 pacientes) ó sin (161 pacientes) Carboplatino. La tasa de RPC mejoró de 37.9% hasta 58.7% cuando se añadió Carboplatino. El segundo estudio es el CALGB40603 (NCT00861705) es un estudio aleatorizado fase II en el cual se valoró el añadir Carboplatino \pm Bevacizumab a un régimen neoadyuvancia con Paclitaxel semanal

seguido de AC en dosis densas en 443 pacientes con CMTN etapas II/III.²⁵ La tasa de RPC aumentó de 41% hasta 54% cuando se adicionó el Carboplatino; el Bevacizumab no brindó ningún beneficio. Es importante saber que ninguno de los dos estudios previamente mencionados, valoró el impacto de la RPC obtenida en el Período Libre de Enfermedad (PLE) ni la Sobrevida Global (SG).

Podemos concluir que el añadir agentes platinados al régimen de QT/NEO, en pacientes con CMTN resulta en una tasa más elevada de RPC.²⁵ El Carboplatino ha demostrado su actividad en pacientes con CMTN y mutaciones germinales de *BRCA1/2*.

2) Estructura y función de *BRCA*

Los genes *BRCA1/2* pertenecen a la familia supresora de tumores debido a su capacidad de reparar ADN dañado a través de un proceso conocido como reparación de la doble cadena de ADN.⁴⁵ Por lo tanto una mutación heredada en cualquiera de estos genes combinada con la pérdida de heterocigosidad predispone a las células a la inestabilidad cromosomal y aumenta potencialmente la probabilidad de transformación maligna y desarrollo de cáncer.

El síndrome cáncer de mama y ovario hereditario es la causa de un 90% de los cánceres de ovario hereditarios que frecuentemente está asociado con mutaciones en los genes *BRCA1/2*. Las bases genéticas del síndrome cáncer de mama y ovario hereditario son una mutación germinal heredada en un alelo de los genes de *BRCA1* ó *BRCA2* y una subsecuente pérdida de la heterocigosidad en los tejidos somáticos.⁴⁶ Algunas de las características principales de este síndrome incluyen múltiples miembros familiares con cáncer de mama/ovario, historia personal de cáncer de mama y ovario, desarrollo de cáncer de mama u ovario a una edad temprana, así como historia familiar de cáncer de mama masculino.⁴⁶

El gen de *BRCA1* fue clonado por primera vez en 1994 como uno de los genes que confieren predisposición genética al inicio temprano del cáncer de mama y de ovario. La primera evidencia contundente que sugirió la presencia de un gen susceptible para el cáncer de mama fue presentada por Hall et al en 1990,⁴⁷ documentando una estrecha relación entre el cromosoma 17q21 en familias con inicio temprano de cáncer de mama. La relación de *BRCA2* con el cáncer de mama de inicio temprano fue descubierta en 1994.⁴⁸ Desde entonces, el análisis Genético es utilizado en la educación, manejo de decisiones y pronóstico de las pacientes con cáncer de mama.⁴⁹ Entender la biología estructural de *BRCA1* y *BRCA2* es importante para comprender tanto su función fisiológica como fisiopatológica.

a) Estructura de *BRCA 1*

En su estado normal el gen *BRCA1* funciona como un gen supresor de tumores, inhibiendo la proliferación aberrante de células tumorales. *BRCA1* está compuesto por 22 exones y codifica para una proteína de 1,863 residuos de aminoácidos (Figura 1). La proteína presenta un dominio de dedos de zinc tipo “RING” en su región amino terminal y dos repetidos tipo “BRCT” en la región carboxilo terminal.⁵⁰

a) Estructura de *BRCA2*

El gen *BRCA2* presenta 26 exones que codifican para una proteína de 3,418 aminoácidos (Figura 2). La proteína que codifica este gen presenta ocho copias de un repetido conocido como “BRC”, estos repetidos tienen la capacidad de interactuar con otras proteínas como RAD51, implicada en la reparación y recombinación del DNA.^{51, 52} *BRCA2* está localizado en el brazo largo (q) del cromosoma 13 en la posición 12-3 (13q12-3) y tiene 84,188 pares de base de largo.⁴⁸ *BRCA2* está caracterizado por un exón 11 muy largo el cual codifica motivos de péptidos requeridos para la interacción con la proteína RAD51⁵³.

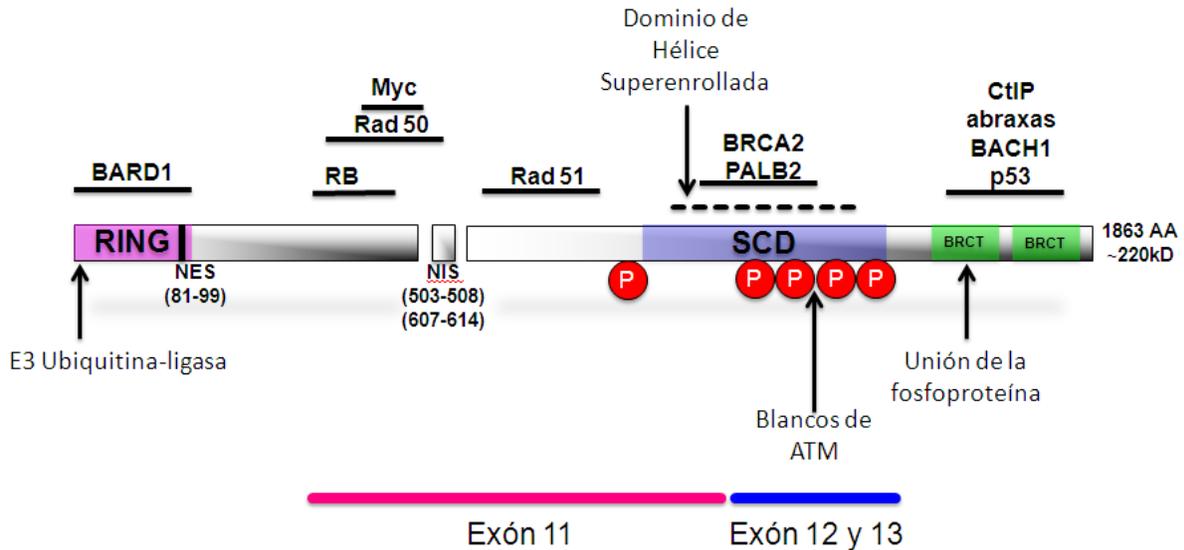


Figura 1. Mapa del dominio de *BRCA1*

En su estado normal *BRCA1* funciona como un gen supresor de tumores, inhibiendo la proliferación aberrante de las células tumorales. Las mutaciones de *BRCA1* ocurren en su mayor porcentaje en el dominio RING, exones 11-13 y el dominio BRCT. El dominio RING que contiene serina (SCD), así como el dominio BRCT están indicados en la figura como secuencias NES y NLS. Las líneas sólidas horizontales indican dominios de unión proteica específicos. Los círculos de color rojo indican sitios de fosforilación.⁵⁴

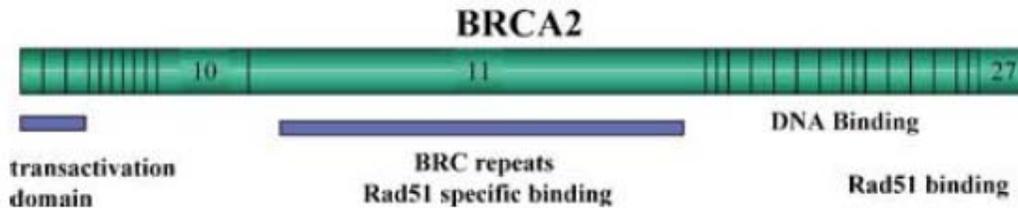


Figura 2. Estructura de *BRCA2*

Estructura esquemática de *BRCA2*, demostrando detalles clave y sus dominios. *BRCA2* está caracterizado por un exón 11 muy largo, contiene los ocho motivos peptídicos de “BRC” que son importantes para la interacción con RAD51. Un dominio de unión ADNss se encuentra en la terminal-C de *BRCA2*.⁵⁵

b) Funciones de *BRCA1/2*

BRCA1 ha sido implicado en varias funciones celulares importantes: reparación al ADN dañado, ubiquitinación, control del ciclo celular y apoptosis, así como regulación de la transcripción (Figura 3). Aunque las estructuras de los genes *BRCA1* y *BRCA2* son muy diferentes, al menos algunas funciones se encuentran interrelacionadas. *BRCA1/2* se encuentran involucrados en la regulación de la proliferación celular, estabilidad cromosomal y la reparación del ADN por medio de la RH.⁵⁶⁻⁵⁹ *BRCA2* se une a la cadena sencilla del ADN e interactúa directamente con la recombinasa RAD51 para estimular la invasión de la cadena, un paso vital de la recombinación homóloga (Figura 4).

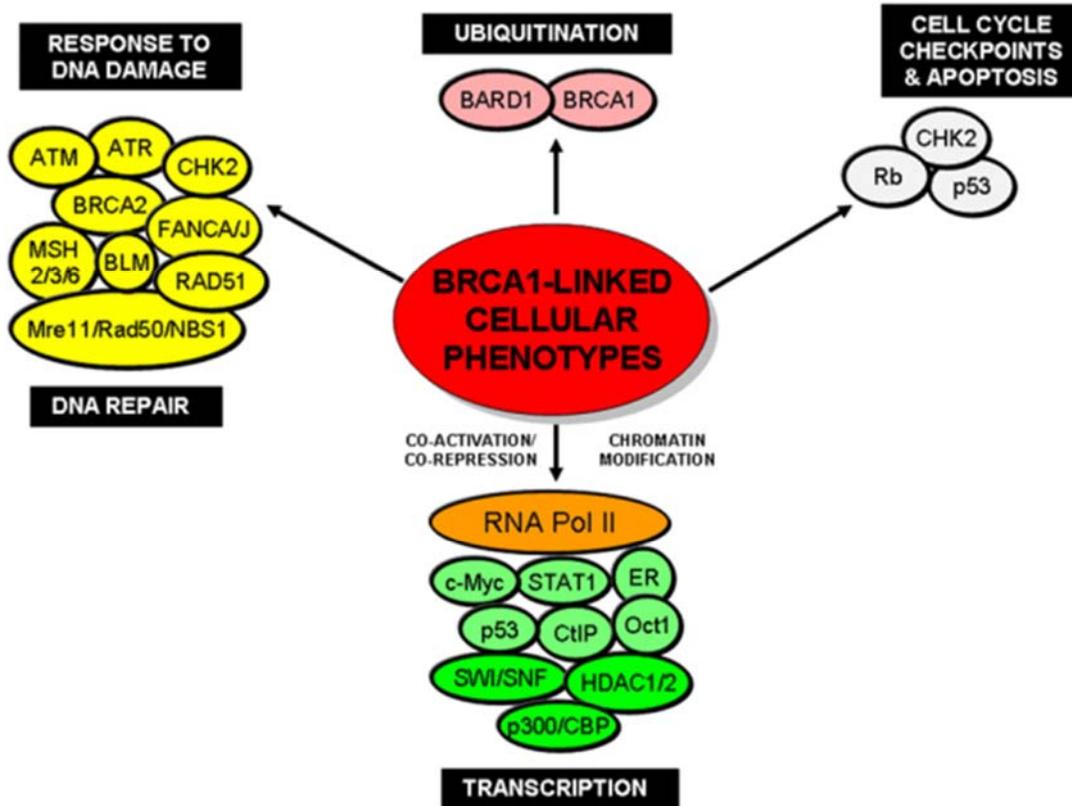


Figura 3 Funciones de BRCA

BRCA1 tiene un papel central en la respuesta del daño al ADN, la cual se inicia a partir de insultos tales como el uso de agentes quimioterapéuticos basados en platino. Varios inhibidores moleculares pueden tener como diana a BRCA1 de manera directa o indirecta, resultando en la falla de reparación del ADN y como consecuencia la apoptosis celular.^{60, 61}

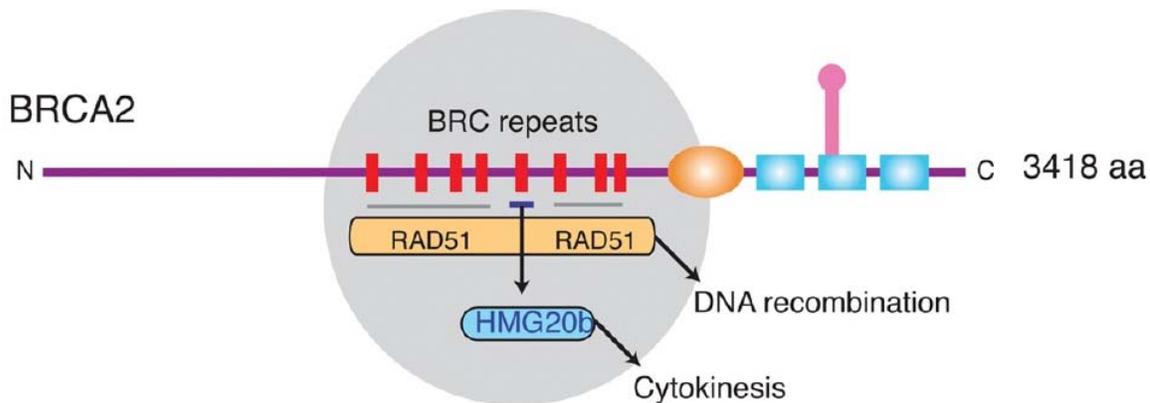
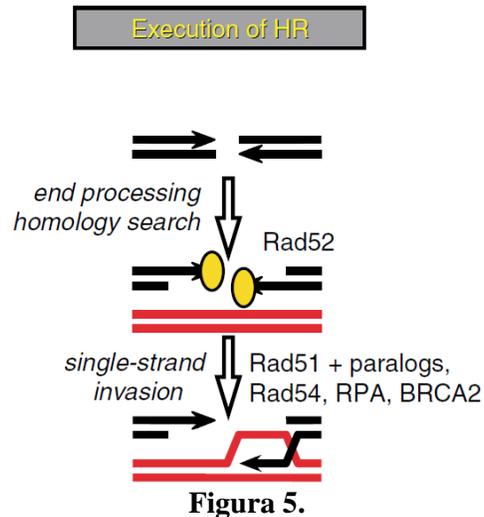


Figura 4 Recombinación Homóloga

Representación esquemática de la interacción de BRCA2 con la proteína RAD 51. El círculo gris enfatiza la influencia recíproca de los 8 repetidos de “BRC” con la proteína RAD51, fenómeno clave en la vía de Recombinación Homóloga del ADN. BRC5 se une directamente a HMG20B, y esta interacción regula una función, aún desconocida, para HMG20B en el proceso de división celular por la citocinesis.⁶²

La localización del RAD51 con respecto a las rupturas de la doble cadena requiere la formación del complejo BRCA1-PALB2-BRCA2. PALB2 (Partner and localizer of BRCA2)⁶³ puede funcionar de

manera sinérgica con una quimera de BRCA2 (piBRCA2) para posteriormente promover la invasión de la cadena de ADN (Figura 5).⁶⁴ BRCA1 y p53 han demostrado igualmente tener una interacción funcional,⁶⁵ y la tumorigénesis puede resultar cuando la inhibición de BRCA1 y la mutación de p53 actúan de manera sinérgica para incitar la inestabilidad cromosómica.⁶⁶



La vía de la Recombinación Homóloga es un proceso complejo que involucra múltiples proteínas.⁵⁵

3) Importancia clínica de las anomalías de BRCA

a. Mutaciones

El cáncer de mama esporádico ocurre aproximadamente en 90% de los casos; por el contrario menos del 10% de los casos de cáncer de mama están asociados con una mutación genética germinal (heredada). La mayoría de las mujeres con un cáncer de mama hereditario son portadoras de una mutación en uno de los dos genes susceptibles del cáncer de mama *BRCA1* localizado en el cromosoma 17q21 y *BRCA2* localizado en el cromosoma 13q12-13.⁶⁷ El patrón de herencia de las mutaciones de *BRCA1* y *BRCA2* es autosómico dominante, altamente penetrante. De manera menos frecuente el cáncer de mama está asociado a otros síndromes hereditarios, tales como Li-Fraumeni y Cowden los cuales están asociados a mutaciones en los genes TP53 y PTEN respectivamente

En pacientes con CMTN que no fueron seleccionadas por edad ó historia familiar, se encontró una incidencia de mutaciones de *BRCA1* de 9-28% así como una incidencia de mutaciones de *BRCA2* de 4-17%.⁶⁸ Más de 1700 mutaciones únicas de *BRCA1* han sido reportadas al *Breast Cancer Information Core Database*.⁶⁹ De estas mutaciones, 858 han sido confirmadas como “clínicamente significativas”. Las mutaciones clínicamente significativas son aquellas que causan un riesgo elevado de cáncer y resultan en una proteína con función reducida o en la ausencia de un producto proteico. Tres dominios de la proteína de *BRCA1* se encuentran mutados en pacientes con cáncer de mama con una frecuencia relativamente alta.^{70, 71} Estos dominios incluyen el dominio RING (exones 2-7), una región codificada por exones 11-13, y el dominio de BRCT (exones 16-24) (Figura 1).

La pérdida de función de *BRCA1* ha sido identificada en pacientes con cáncer de mama y ovario esporádico y familiar. En los tumores esporádicos se presenta la expresión reducida de un gen normal, mientras que en el cáncer familiar una mutación germinal patogénica de *BRCA1* es detectada. Los portadores de estas mutaciones germinales tienen un riesgo de por vida de desarrollar cáncer de mama (50-85%) y cáncer de ovario (15-60%).^{50, 72}

b. BRCAness en el cáncer de mama

La definición BRCAness comenzó a ser utilizada en 1996 después de que estudios en los genes *BRCA1/2* en el cáncer esporádico de ovario demostraron múltiples defectos en la vía de BRCA capaces de explicar un fenotipo similar a aquellos con *BRCA* mutado.⁷³⁻⁷⁸ Hoy en día el término

BRCAness se utiliza para describir los cambios genéticos y epigenéticos en tumores esporádicos que resultan en la ruptura de doble cadena de DNA, teniendo como consecuencia una menor capacidad de reparar estas lesiones mediante el mecanismo de RH, y demostrando mayor respuesta al tratamiento con inhibidores del PARP así como a los agentes quimioterapéuticos que atacan al ADN.^{5, 79-81}

El grupo de Tan y colaboradores, han propuesto un síndrome clínico de BRCAness, que ocurre entre el 10-15% de pacientes con cáncer epitelial de ovario (CEO) y con mutaciones asociadas a los genes de *BRCA1/2*. Este síndrome se caracteriza por 1) alta respuesta global (95.5% vs 59.1%; $P = .002$) así como alto grado de respuestas completas (81.8% vs 43.2%; $P = .004$) al tratamiento de primera línea basado en platino; 2) alto grado de respuesta a la quimioterapia basada en platino en la primera recaída así como en recaídas subsecuentes; 3) largos periodos libres de tratamiento entre las recaídas (5 vs 1.6 años; $P = .001$) 4) aumento en la sobrevida global (8.4 vs 2.9 años; $P = .002$) (especialmente en los estadios más avanzados) y 5) tumores que son usualmente, pero no exclusivamente, de histología serosa.⁷⁹

Las características fenotípicas de BRCAness reflejan una función defectuosa de la vía de *BRCA* en las células neoplásicas. Los defectos moleculares que conducen al fenómeno de BRCAness, son los siguientes.⁸²

DEFECTOS MOLECULARES QUE PUEDEN LLEVAR A BRCAness	
MECANISMOS ALTERADOS	% EN CANCER DE OVARIO
Mutaciones germinales en <i>BRCA1/2</i>	10-15
Mutaciones somáticas en <i>BRCA1/2</i>	5-10
Metilación del promotor de <i>BRCA1</i>	5-30
Amplificación del gen <i>EMSY</i>	20
Complejo de anemia de Fanconi	21
Deleción/mutación focal de <i>PTEN</i>	7
Hipermetilación de <i>Rad51C</i>	3
Mutación de <i>ATM/ATR</i>	2

Tabla 4. Defectos moleculares que conducen al fenómeno de BRCAness

i. BRCAness y los procesos epigenéticos

El término de epigenética fue acuñado por Waddington en 1953 para referirse al estudio de las interacciones entre los genes y el ambiente que se produce en los organismos. La epigenética estudia todos aquellos factores no genéticos que intervienen en el desarrollo de un organismo así como en la expresión genética sin cambio en la secuencia de nucleótidos.⁸³

Poniendo de lado al grupo de pacientes con mutaciones de *BRCA*, podemos concluir que el patrón del comportamiento biológico y clínico de BRCAness es el resultado de diferentes procesos epigenéticos. La metilación aberrante del promotor de *BRCA1* en las islas CpG ha demostrado que causa una disminución en la expresión de *BRCA1* en 5-30% de los tumores ováricos resultando en BRCAness.^{74-76, 84} Chiang y colaboradores demostraron que la metilación del promotor de *BRCA1* puede ser un factor pronóstico particularmente adverso cuando se le comparó con las mutaciones germinales de *BRCA1*.⁸⁵

ii. Metilación del promotor como mecanismo de silenciamiento protéico

La carcinogénesis puede ocurrir como resultado de alteraciones en distintos componentes epigenéticos. Entre ellos uno de los procesos epigenéticos más estudiados en cáncer es la metilación del DNA. Esta es la incorporación de un grupo metilo en la posición 5 de la citocinas que conforman principalmente los dinucleótidos CpGs. Con respecto a la metilación del DNA en el cáncer, se han reportado principalmente dos fenómenos trascendentales, por un lado la hipometilación global, la

cual permite la desestabilización de secuencias repetidas y la expresión de múltiples genes silenciados como los transposones; y por otro lado es la hipermetilación local del DNA.⁸⁶ Este mecanismo se observa principalmente en unas regiones ricas en Citocinas y Guaninas las cuales se conocen como islas CpGs (Figura 6). Actualmente se ha reportado que más del 60% de los promotores génicos están embebidos en islas CpG, por lo cual la hipermetilación de éstas regiones impacta fuertemente en la regulación de la expresión de múltiples genes, como los genes supresores de tumores y genes de reparación del DNA, entre otros.⁸⁷⁻⁹⁰ La inactivación de los genes supresores de tumores a menudo resulta en la proliferación anormal o supervivencia celular aberrante, resultando en la transformación maligna.^{87, 88, 91} La metilación aberrante de DNA en los sitios CpG, en la región promotora de un gen, puede causar alteraciones en la expresión génica y por lo tanto en la traducción de la proteína del gen. Una disminución en la abundancia de la proteína de BRCA1 puede ocurrir de igual manera a través de la metilación de la región promotora del gen; diversos estudios han demostrado que la metilación de la región promotora de *BRCA1* usualmente lleva a una expresión disminuida de su proteína en los tumores ováricos.⁹²⁻⁹⁴

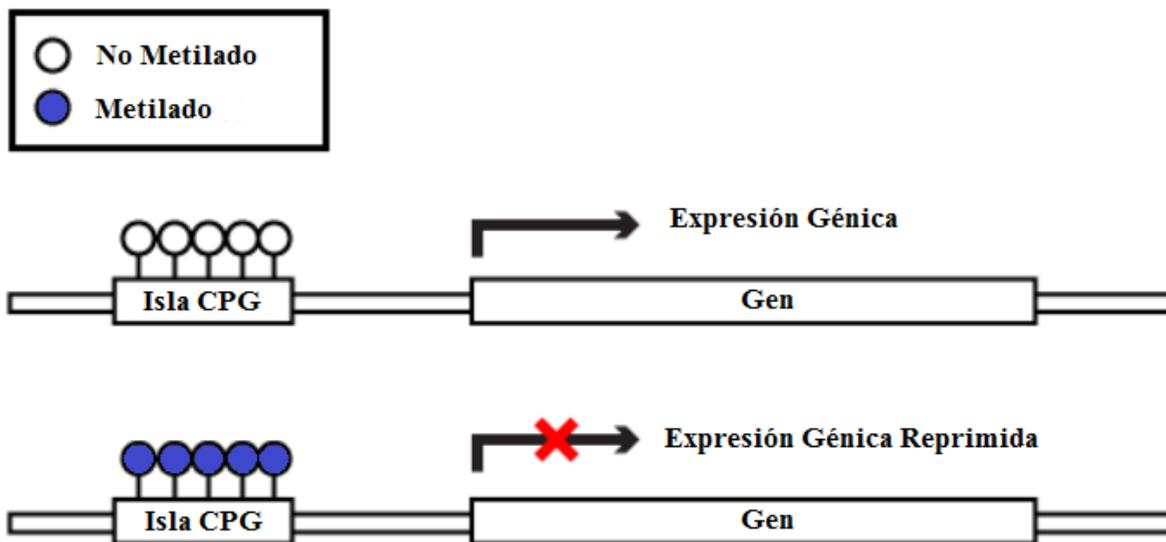


Figura 6 Metilación del promotor.

En el ADN genómico, un grupo metilado puede ser añadido a la citosina para formar una 5-metilcitosina. Este proceso es conocido como metilación del ADN y principalmente ocurre en citosinas que son seguidas por una guanina (5'CG3'). Muchos genes en el genoma humano tienen regiones ascendentes (upstream direction [3' --> 5']) ricas en CG llamadas islas CpG. La metilación del ADN de la isla de CpG en un gen reprime la expresión genética.

El gen *BRCA1* presenta un promotor el cual se encuentra embebido en una isla CpG. En este promotor se caracterizó una región conocida como “PRR” (de sus siglas en inglés “Positive Regulatory Region”), la cual es crucial para que el gen presente una regulación adecuada de la transcripción.⁹⁵ En el cáncer de mama esporádico se ha demostrado la metilación aberrante del DNA en ésta región así como su asociación con la pérdida de expresión del gen, y una pobre supervivencia global, sugiriendo su importancia en la regulación de la expresión del gen.^{96, 97} Posteriormente en el 2004 el grupo de Butcher y colaboradores demostraron la presencia de la proteína CTCF, la cual tiene la capacidad de proteger al promotor de *BRCA1* en contra de la metilación del DNA, la pérdida de dicho factor en cáncer de mama se ha asociado con la hipermetilación del promotor del gen.^{98, 99} Por otro lado, el promotor del gen *BRCA2* se localiza en la región -66 1 129 con relación al sitio de inicio de transcripción. Esta región también se encuentra asociada a una isla CpG.¹⁰⁰ Al igual que *BRCA1*, el promotor del gen *BRCA2* se ha reportado metilado en pacientes con cáncer de mama y/o ovario.^{78, 101} Sin embargo a diferencia de *BRCA1*, la hipermetilación del promotor del gen de *BRCA2* no ha sido reportada como una causa de su inactivación y por lo tanto carece de significado

clínico hasta el momento,¹⁰² lo que sugiere que otros mecanismos epigenéticos pueden estar involucrados en su silenciamiento génico.

Recientemente se ha demostrado que el factor transcripcional CTCF protege al promotor de *BRCA1* en contra de una metilación del DNA aberrante. En muestras de tumores de cáncer de mama se ha demostrado la disociación de éste factor al promotor del gen y por ende el silenciamiento de *BRCA1* por metilación del DNA.^{98, 99} Un estudio subsecuente indicó que la metilación de la región promotora de *BRCA1* puede ser un factor pronóstico particularmente adverso cuando se le comparó con las mutaciones germinales de *BRCA1* y con la ausencia de mutación.⁸⁵ En otro reporte se observa que el silenciamiento epigenético de *BRCA1* y las mutaciones de *BRCA1/2* son mutuamente exclusivas; las pacientes con silenciamiento epigenético de *BRCA1* se caracterizaron por tener un pronóstico similar con aquellas portadoras del tipo silvestre (sin mutaciones). Particularmente en pacientes con CEO, un perfil de expresión tipo *BRCA* estuvo asociado a periodos de supervivencia prolongados,¹⁰³ probablemente debido a una buena respuesta a la quimioterapia basada en Platino.

iii. Reducción de la abundancia proteica de *BRCA1*

En el cáncer esporádico de mama u ovario, la abundancia de la proteína *BRCA1* se encuentra reducida en aproximadamente un tercio de las pacientes.^{104, 105} Esta reducción de la abundancia puede ser el resultado de diferentes factores tales como: pérdida de un alelo de *BRCA1*, falta de regulación transcripcional,¹⁰⁶ corte-empalme alternativo,¹⁰⁷ o metilación aberrante de la región promotora del gen.¹⁰⁸ Los defectos en la localización sub-celular de la proteína de *BRCA1* han sido igualmente reportados.¹⁰⁹

El factor de riesgo más importante para el desarrollo de CEO es una historia familiar de cáncer de mama y/o ovario asociado con mutaciones germinales en *BRCA1* o *BRCA2*, alcanzando entre un 5-15% de los casos de CEO.¹¹⁰ No obstante, *BRCA* se ha encontrado con disminución de regulación en un 15%-72% de los casos esporádicos de CEO por medio de mecanismos epigenéticos.^{76, 111, 112} Por lo tanto la deficiencia de *BRCA1* es significativa en la patogénesis del CEO esporádico y hereditario.

4) Terapias blanco en el cáncer de mama triple negativo *BRCA*ness positivo

a. El papel del PARP en el cáncer de mama triple negativo

Las células con deficiencias en los genes de la vía de RH son incapaces de reparar las RDC-ADN por medio de RH libre de errores, resultando en inestabilidad genómica y la predisposición a la transformación maligna. Los genes con deficiencias en la RH han demostrado que confieren una sensibilidad extrema a la inhibición de la poli-ADP ribosa polimerasa (PARP).^{113, 114}

Las PARP son una familia de 17 proteínas intranucleares, la más abundante es PARP 1, que catalizan la polimerización de Poly ADP-ribosa a partir de un substrato de dinucleótido de nicotinamida adenina (NAD⁺).¹¹⁵ Ellas juegan un papel primordial en la reparación de las rupturas de cadena simple de DNA por medio del mecanismo de reparación de escisión de bases; la inhibición del PARP resulta en la deficiencia de la reparación de rupturas de cadena simple (Figura 7). Las rupturas de cadena simple que quedan sin reparar y que posteriormente se encuentran con una horquilla de replicación de DNA resultan en rupturas de cadena doble. Las células normales son capaces de reparar las rupturas de cadena doble por medio de la vía de reparación de RH. Sin embargo, las células con *BRCA* defectuoso son incapaces de reparar las rupturas de cadena doble debido a deficiencias en la vía de RH y se ven forzadas a utilizar la vía de unión de extremos no homólogos (NHEJ, por sus siglas en inglés).^{113, 116} La NHEJ se desarrolla mediante la escisión del DNA y la inserción posterior de fragmentos intactos de DNA. Este mecanismo de reparación es menos eficaz que la RH, porque se satura de forma temprana, y conlleva a un cúmulo de aberraciones cromosómicas (tales como translocaciones y fusión de los telómeros) que pueden desencadenar procesos de carcinogénesis.^{60, 117}

La inestabilidad genómica resultante lleva finalmente a la muerte celular. Las células con deficiencia en el mecanismo de RH son particularmente sensibles a la terapia con platino debido a que son incapaces de reparar el daño al DNA causado por los compuestos de platino.^{113, 114, 118}

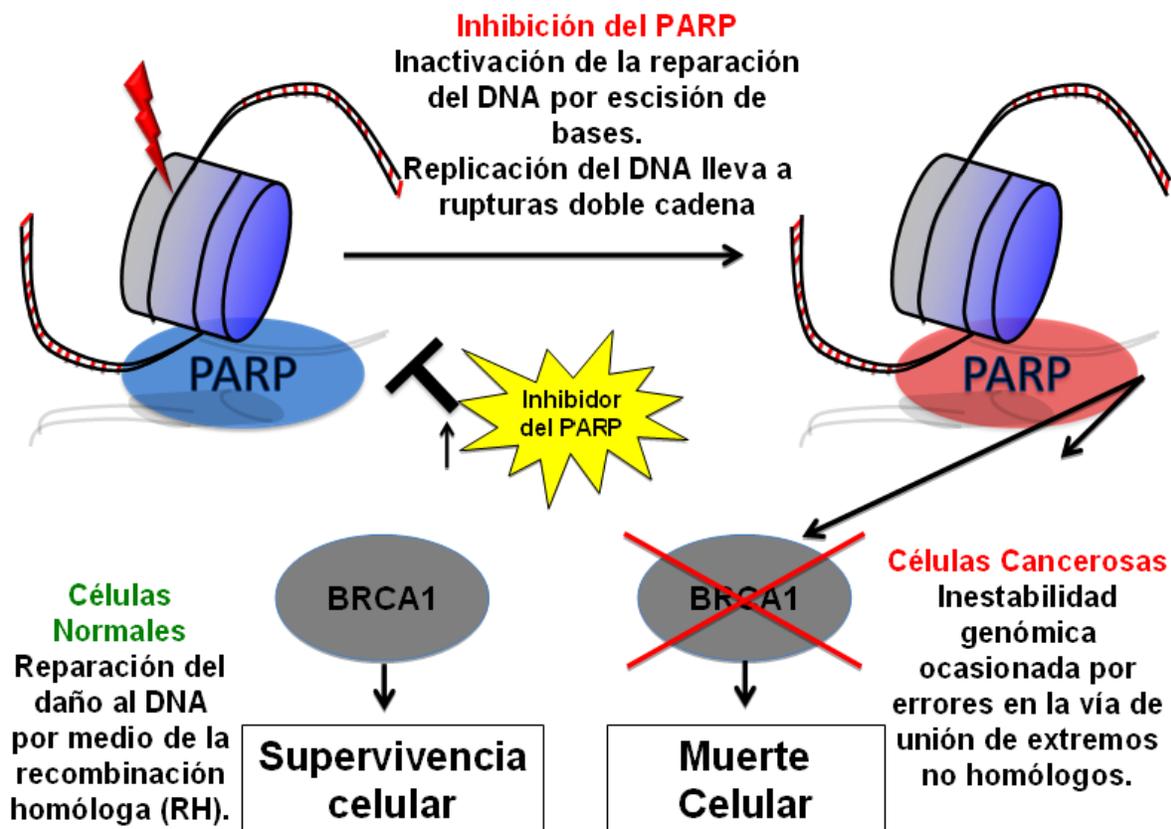


Figura 7. Terapia diana de BRCA1 en el cáncer de mama.

BRCA1 es pieza clave en la respuesta al daño de DNA, la cual se inicia como consecuencia de insultos a su estructura tal como es el uso de agentes quimioterapéuticos basados en platino. Diversos inhibidores moleculares pueden tener como diana a BRCA1 de manera directa o indirecta, conduciendo a una falla en la reparación del DNA dañado y finalmente a la apoptosis.

Las células con *BRCA1/2* deficientes, en comparación con el fenotipo silvestre, son extremadamente sensibles a la terapia con inhibidores del PARP. Existen al menos tres potenciales funciones de los inhibidores del PARP en el tratamiento del cáncer de mama:

- 1) Sensibilización a la quimioterapia y la radioterapia
- 2) Letalidad sintética en pacientes con mutaciones hereditarias en los genes de BRCA1/2 (defectos heredados en la recombinación homóloga)
- 3) Tratamiento de pacientes con tumores que posean BRCA deficiente, BRCAness, así como defectos en la reparación de DNA tales como aquellos vistos en el CMTN.

III. HIPÓTESIS DEL PROYECTO

La hipermetilación del DNA en el promotor BRCA1 y/o la baja expresión de BRCA1/2, contribuyen al fenotipo BRCAness en pacientes con cáncer de mama triple negativo sin mutaciones somáticas y germinales en BRCA1/2. En el tratamiento con Antraciclinas y Taxanos, las pacientes con CMTN portadoras del fenotipo BRCAness se asociarán a una menor respuesta patológica completa, así como una recurrencia más pronta en comparación con aquellas BRCAness negativas.

IV. DISEÑO DEL ESTUDIO



Figura 8. Diseño del estudio.

CMTN: Cáncer de Mama Triple Negativo, SG: Sobrevida Global,
PLE: Período Libre de Enfermedad

V. GRUPOS DE ESTUDIO

Grupo1: Pacientes con CMTN localmente avanzado tratadas con QT-NEO convencional BRCAness positivas.

Grupo2: Pacientes con CMTN localmente avanzado tratadas con QT-NEO convencional BRCAness negativas.

VI. TAMAÑO MUESTRAL:

Estudio retrospectivo de pacientes con diagnóstico de CMTN localmente avanzado, tratadas con QT-NEO convencional entre 01. Abril. 2007 – 01. Abril. 2010, con un seguimiento mínimo de 5 años posterior a la QT-NEO. Un total de 156 pacientes con CMTN localmente avanzado tratadas con QT-NEO convencional.

VII. ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

La fecha de primera recurrencia (PR) fue definida como el primer signo de progresión de enfermedad basada en estudios de imagen según los criterios de RECIST. La medida de PLE fue definida como el período de tiempo entre el inicio del primer tratamiento (QT-NEO) y la fecha de primer recurrencia. La SG se calculó desde la fecha de inicio de tratamiento (QT-NEO) hasta la fecha de muerte de la paciente debido a cáncer de mama (tiempo cuantificado en meses) para pacientes con BRCAness (+/-), y Etapa Clínica (EC) mediante la prueba de Kaplan-Meier log rank. Odds ratio será realizado utilizando regresión logística multivariada y aplicando el modelo proporcional Odd para valorar la evidencia de no asociación entre BRCA1/2 y otros parámetros clínicos (edad, grado histológico y etapa clínica) en el análisis de sobrevida. Todos los análisis estadísticos serán realizados utilizando el software R. Nosotros definimos el intervalo libre de tratamiento (ILT) como el tiempo entre cada línea de tratamiento y esto fue calculado desde la fecha del último ciclo de quimioterapia de primera línea hasta la fecha del primer ciclo de quimioterapia de segunda línea.

Criterios de inclusión: Pacientes con diagnóstico de CMTN localmente avanzado tratadas con QT-NEO y llevadas a cirugía posterior al tratamiento neoadyuvante entre 01. Abril. 2007 – 01. Abril. 2010, en el Instituto Nacional de Cancerología.

Criterios de exclusión: Pacientes con perfil molecular diferente al Triple Negativo, pacientes que no hayan sido tratadas con QT-NEO, pacientes en etapa metastásica.

Criterios de eliminación: Pacientes con expedientes incompletos en donde no se encuentre un registro adecuado de las variables por analizar.

Análisis de variables:

1. Edad al momento de diagnóstico.
2. Diagnóstico de Hipertensión arterial y/o Diabetes Mellitus.
3. Índice de masa corporal.
4. Número de embarazos.
5. Uso de anticonceptivos orales.
6. Etapa clínica al momento del diagnóstico.
7. Tipo histológico.
8. Grado de Scarff-Bloom-Richardson (SBR).
9. Permeación linfovascular.
10. Estado inmunohistoquímico de RE, RP y HER2.
11. PR, SG, PLE, ILT.
12. Antecedente familiar de cáncer de mama.
13. Estado funcional.
14. Quimioterapia neoadyuvante administrada.
15. Respuesta Patológica Completa.
16. Presencia de márgenes positivos.
17. Realización de ganglio centinela y reporte histopatológico.
18. Realización de disección radical axilar y reporte histopatológico.

Período de realización del proyecto de investigación: Pacientes con diagnóstico de CMTN localmente avanzado, tratadas con QT-NEO convencional entre 01. Abril. 2007 – 01. Abril. 2010, en el Instituto Nacional de Cancerología, con un seguimiento mínimo de 5 años posterior a la QT-NEO.

VIII. OBJETIVOS

Objetivo: Investigar si la presencia del fenotipo BRCAness puede predecir la respuesta al tratamiento con QT-NEO basada en Antraciclinas y Taxanos en pacientes con CMTN localmente avanzado.

1) Objetivo Primario: Determinar el papel de la metilación del DNA en la inactivación de la expresión de los genes de BRCA1/2 y su repercusión como potencial marcador de BRCAness en el CMTN.

2) Objetivos secundarios:

- i. Analizar el genotipo germinal y somático de los genes BRCA1/2 en las muestras analizadas.
 - ✓ Seleccionar a los tumores sin mutaciones somáticas ni germinales para BRCA1/2.
- ii. Evaluar los niveles de expresión del gen BRCA1/2.
 - ✓ Analizar el impacto de la expresión del gen BRCA1/2 en la respuesta al tratamiento con QT-NEO basado en Antraciclinas y Taxanos.
 - ✓ Determinar el Período Libre de Enfermedad (PLE) en pacientes con CMTN y su relación con expresión del gen BRCA1/2.
- iii. Analizar el estado de metilación del DNA sobre el promotor de BRCA1.

- ✓ Analizar el impacto del estatus de metilación del DNA sobre el promotor de BRCA1 en la respuesta al tratamiento con QT-NEO basado en Antraciclinas y Taxanos.
- ✓ Determinar el PLE en pacientes con CMTN y su relación con el estatus de metilación del DNA sobre el promotor de BRCA1.

IX JUSTIFICACIÓN

Las pacientes con cáncer de mama BRCAness positivo han demostrado una sobrevida global más prolongada cuando son tratadas con agentes alquilantes,³² sin embargo la QT-NEO convencional en el CMTN localmente avanzado no incluye el uso de estos agentes; por lo tanto es probable que la valoración del estado de BRCAness sea útil únicamente en aquellas pacientes con CMTN. El análisis de los procesos epigenéticos responsables del patrón de BRCAness en el CMTN localmente avanzado, nos permitirá identificar un grupo específico de pacientes que tendrá una respuesta subóptima a la QT-NEO convencional, y una mejor respuesta a la QT-NEO basada en Platino, e inhibidores del PARP.

En la actualidad no existe una prueba de laboratorio estandarizada que pueda detectar la existencia de BRCAness; no obstante varios tipos de técnicas están siendo desarrolladas con la finalidad de personalizar la quimioterapia administrada en las pacientes con CMTN. La valoración del estado de BRCAness ha sido descrita recientemente mediante el uso de Hibridación Genómica Comparativa en array (aCGH) o mediante la Amplificación de Sondas Dependiente de Ligandos Múltiples (MLPA).³² La tasa reportada de BRCAness en pacientes con CMTN, mediante las técnicas de aCGH y MLPA, es de 66–69%, en comparación con 18% cuando se toman en cuenta todos los subtipos de cáncer de mama.^{29, 35, 36} La subclasificación del CMTN BRCAness positivo/negativo tendrá como resultado un tratamiento oncológico individualizado, así como una sobrevida más prolongada y una mejor calidad de vida. Por lo anterior, nuestro proyecto propone la identificación del estado de BRCAness mediante la valoración de la metilación del promotor de BRCA1 por métodos de bisulfito acoplado a secuenciación masiva en pacientes del INCan. Hasta el día de hoy no existe estudio alguno sobre el fenotipo BRCAness (en cualquier tipo de neoplasia) realizado en nuestro país.

X MATERIALES Y MÉTODOS

a) Selección de pacientes.

Criterios de inclusión:

- Pacientes con cáncer primario de mama triple negativo localmente avanzado.
- Pacientes tratadas con QT-NEO basada en Antraciclinas y Taxanos.
- Pacientes llevadas a cirugía posterior al tratamiento neoadyuvante.

Se incluyeron en este proyecto pacientes tratadas con QT-NEO basada en Antraciclinas y/o Taxanos con diagnóstico de Cáncer de Mama Triple Negativo. Para cada paciente se registraron los datos clínicos, asociados con las modalidades de tratamiento, calidad de respuesta terapéutica, así como seguimiento a largo plazo durante al menos 5 años. La respuesta al tratamiento fue recabada de cada expediente obteniéndose las respuestas clínicas, radiológicas y patológicas para cada paciente.

b) Obtención de tejido tumoral, extracción de proteínas, DNA, RNA.

Para la realización de nuestro estudio utilizaremos un fragmento de tejido tumoral, preservado en parafina. El procedimiento de la toma de la muestra se realizará conforme al protocolo aprobado por el comité de ética y el comité científico. Las muestras tumorales serán examinadas por un patólogo capacitado (Dr. Manuel Pérez Sánchez) para evitar la presencia de contaminación con tejido no tumoral.

c) Análisis de mutaciones somáticas y germinales de BRCA 1/2.

Las mutaciones germinales y somáticas en BRCA1/2 se analizarán por secuenciación masiva en el

equipo MiSeq System (Illumina) por medio de comparaciones entre pares de DNA tumor:normal como sigue:

1. Preparación de librerías de ADN para secuenciación masiva. Se emplearán 200 ng de ADN extraído de tumor para amplificar la región codificante los genes BRCA1/2 por medio de metodologías de PCR empleando el kit GeneRead DNA Gene Panel Custom V2 (Qiagen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Las librerías de cada paciente incluirán una etiqueta molecular específica (barcode) para su identificación. El control de calidad de las librerías se realizará empleando el equipo de micro-electroforesis de ácidos nucleicos Bioanalyzer (Agilent).

2. Secuenciación masiva en paralelo de librerías de ADN. Las librerías de cada paciente serán secuenciadas en el equipo MiSeq System (Illumina), empleando el kit MiSeq Reagent kit V3 (Illumina), siguiendo las especificaciones del fabricante. Como control positivo se analizará ADN genómico de pacientes con CMTN que fueron previamente identificados como positivos para mutaciones en BRCA1/2.

3. Análisis bioinformático. Para identificar alteraciones patogénicas en BRCA1/2, las lecturas de secuenciación se mapearán con la secuencia de referencia del genoma humano (GRCh38) de BRCA1/2 empleando el programa GATK. Las alteraciones a considerar serán: cambios del nucleótido, inserciones y deleciones. Las muestras con alteraciones potencialmente patogénicas serán visualizadas y analizadas con los paquetes IGV, Variant Interpreter, Variant Studio, PolyPhen2, SIFT y ANNOVAR, y se cotejarán con bases de datos internacionales de cáncer y variación genética en humanos (ClinVar, COSMIC, 1000 Genomes Project, Exome Sequencing Project NHLBI, dbSNP 141, TCGA) para identificar a las alteraciones con impacto en la función. Para confirmar la presencia de mutaciones potencialmente patogénicas, las muestras serán validadas mediante la amplificación específica por PCR de cada alteración individual y serán analizadas de manera independiente por medio de secuenciación tipo Sanger.

d) RT-qPCR

El RNA extraído será tratado con DNasa I (Invitrogen, Carlsbad, CA) antes de la creación de DNAc usando un hexámero aleatorio cebado y la transcriptasa inversa de MMLV (Invitrogen, Carlsbad, CA). Se utilizará la sonda de imprimación de Applied Biosystems TaqMan (Hs00173233_m1 (BRCA1), Hs00609060_m1 (BRCA2), Hs01920652_s1 (PTEN), Hs00907966_m1 (PIK3CA)) para cuantificar los niveles de expresión del RNAm utilizando QRT-PCR en tiempo real y un Sistema de Detección de Secuencia ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems, Foster City, CA). La expresión relativa de la cuantificación del gen será calculada de acuerdo con el método comparativo Ct que utiliza RNA ribosómico 18S humano (Applied Biosystems, Foster City, CA) y los controles comerciales de RNA (Stratagene, La Jolla, CA). La cuantificación relativa será determinada. Los ratios (en relación expresión génica del tumor: promedio de todos los tumores) menos de X o mayor que XX serán valorados como disminución o aumento de la expresión de RNAm, respectivamente.

e) Metilación del promotor de BRCA1

El estado de metilación BRCA1 de cada tumor será evaluado utilizando una técnica similar a la del ensayo de MethyLight como ha sido previamente descrito por Eads y colaboradores.²⁰ 500 ng de DNA de muestra serán sometidos a modificación de bisulfito de sodio usando el protocolo de EZ DNA Metilación-Gold, según lo recomendado por el fabricante (Zymo Research, Orange, CA). Posterior al tratamiento con bisulfito, el DNA será amplificado por PCR y secuenciado en un secuenciador masivo MiSeq System (Illumina). Las lecturas de secuenciación serán mapeadas contra secuencias de referencia de BRCA1 sin metilación. Se calcularán los índices de metilación (total de bases metiladas/total de bases no metiladas) presentes en los dinucleótidos CpG de las secuencias promotoras en los controles y en los tumores. Se establecerá un punto de corte en los valores de

metilación en los controles contra el cuál serán comparados los índices de metilación de las lecturas tumorales.

XI RESULTADOS

ANÁLISIS DE SOBREVIDA ESPECÍFICA DEL CÁNCER EN PACIENTES CON CMTN		
VARIABLE	TASA DE SOBREVIDA A 5 AÑOS %	P
HISTOLOGÍA		
DUCTAL	51.04	
LOBULILLAR	50.68	.906
OTRO	46.47	
SCARFF-BLOOM-RICHARDSON		
I-II	48.20	.073
III	50.75	
PERMEACIÓN LINFOVASCULAR		
NO	50.43	.417
SI	52.00	
ETAPA CLÍNICA		
II	49.11	.313
III	51.30	
QT-NEO		
CON PLATINO	48.90	.431
SIN PLATINO	52.59	
RPC		
CON PLATINO	56.84	.043
SIN PLATINO	46.34	

Tabla 6. Análisis de sobrevida específica.

No se encontró un impacto positivo en la sobrevida, en el grupo de pacientes tratadas con QT/NEO basada en platino. El grupo de pacientes tratadas con QT/NEO convencional demostró una menor tasa de Respuesta Patológica Completa (P=0.043)

Estudios recientes han demostrado que las mujeres con CMTN y mutaciones germinales de *BRCA*; así como aquellas con silenciamiento epigenético de *BRCA*, responden mejor cuando son tratadas con QT/NEO basada en platino debido a que poseen defectos en la vía de Recombinación Homóloga, fenómeno conocido como *Letalidad Sintética*. Es necesario identificar aquellas pacientes con CMTN que tendrán una respuesta superior a la QT/NEO basada en Platino mediante la determinación de *BRCA* deficiente.

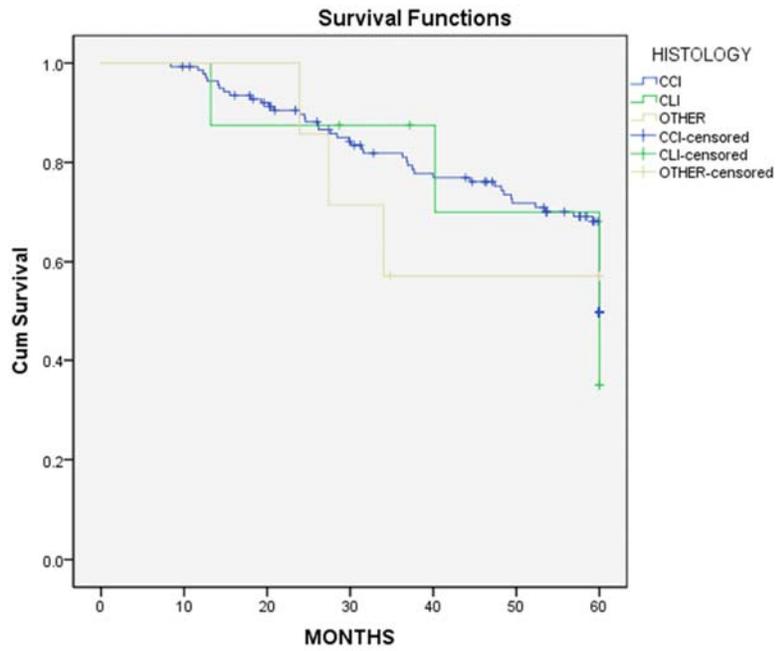


Figura 9. Sobrevida Global por grupo histológico.

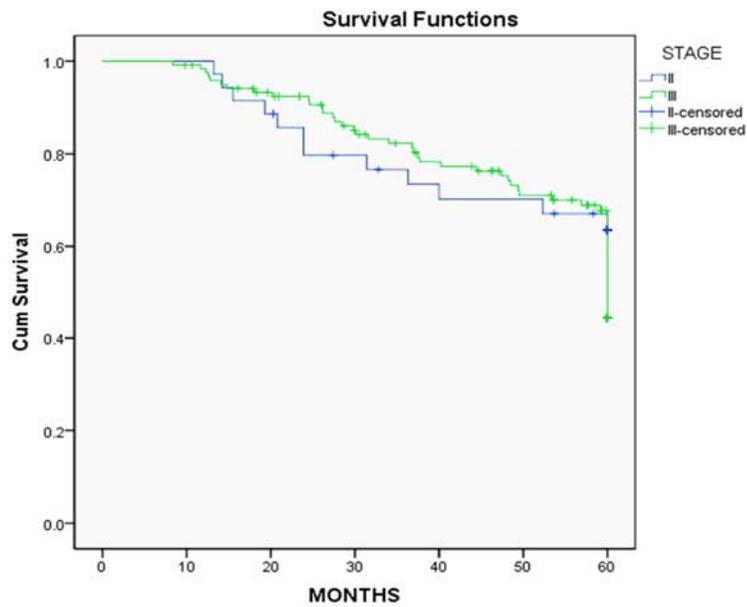


Figura 10. Sobrevida Global por etapa clínica.

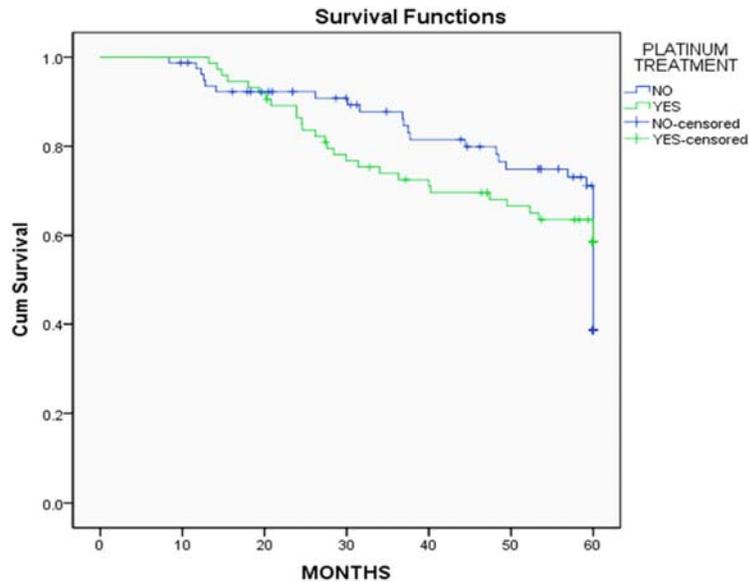


Figura 11. Sobrevida Global por grupos de quimioterapia neoadyuvante con o sin Platino.

Las pacientes con tumores BRCAness positivos tienen un mayor período de sobrevida cuando son tratadas con agentes alquilantes. Las mutaciones germinales en los genes de BRCA1/2 han sido asociadas con $\leq 15\%$ de los casos de CMTN, sin embargo el grupo de pacientes que se beneficiarán del tratamiento con quimioterapia blanco y/o inhibidores del PARP puede ser mayor cuando se administra en aquellas que son portadoras de BRCAness; en comparación con aquellas con mutación de BRCA1/2. En nuestro estudio la QT/NEO basada en Platino no demostró tener un impacto positivo en la SG en comparación con la QT/NEO convencional, sin embargo encontramos una mayor tasa de RPC en el grupo de pacientes tratadas con QT/NEO basada en Platino ($P=0.043$). Existe una necesidad imperativa del desarrollo de biomarcadores que tengan la capacidad de predecir la respuesta a la quimioterapia en pacientes con CMTN; la determinación del estado de BRCAness previo a la administración de QT/NEO basada en Platino puede llegar a tener un impacto positivo y significativo en la sobrevida de este grupo de pacientes.

XII DISCUSIÓN

El Cáncer de Mama Triple Negativo es una enfermedad compleja. Su relativa infrecuencia, agresividad así como impresionante heterogeneidad han sido solo algunos de los retos con los que los investigadores y los clínicos se enfrentan constantemente al tratar de lograr avances en el tratamiento de esta enfermedad.

La presencia del fenotipo BRCAness ha sido identificada así mismo, en otras neoplasias que afectan a la mujer. La evaluación de expresión de BRCA1/2 en el cáncer de ovario ha demostrado tener un impacto clínico. Hace más de una década se propuso que la ausencia/disminución de la abundancia proteica de BRCA1 se encuentra fuertemente relacionada con el Cáncer Epitelial de Ovario (CEO).¹¹⁹ Existen diversos estudios que han demostrado una reducción en la abundancia de *BRCA1* en el CEO esporádico comparado con el tejido ovárico normal, al ser evaluado por técnicas tales como la inmunohistoquímica (IHQ), estimación de pérdida de la heterocigosidad, niveles de ARNm, e hipermetilación de la región promotora de BRCA1.¹²⁰ Evidencia reciente sugiere que la deficiencia de *BRCA1* puede influir en la sobrevida de las pacientes con CEO. En la enfermedad esporádica, la reducción del RNAm de BRCA1 así como los niveles de la proteína se correlacionan con un aumento en la supervivencia indicando de esta manera el uso potencial de BRCA1 como un marcador pronóstico.^{112, 118, 121-124}

En los últimos 12 años, 1,791 casos de cáncer ovárico han sido analizados utilizando diferentes técnicas de laboratorio con la finalidad de evaluar la expresión de *BRCA1/2* (Tabla III). Como resultados, se encontró que: la expresión reducida o ausente de *BRCA1* está asociada con un estadio avanzado de la enfermedad (III/IV)^{118, 122}, grado alto (2/3)^{118, 123, 125}, histología serosa^{122, 123}, y edad joven al diagnóstico (51-59 años de edad).^{123, 126, 127} Todos los estudios publicados que evaluaron la correlación entre la sobrevida y la reducción/ausencia en la abundancia proteica de *BRCA1* en el CEO esporádico, excepto uno¹¹¹, lograron demostrar un impacto positivo en el resultado clínico de las pacientes.

Con el objetivo de evaluar la efectividad en la detección de la proteína de *BRCA1/2* como herramienta predictiva en el resultado clínico de pacientes con cáncer de ovario, se realizó una revisión sistemática de la literatura la cual nos permitió encontrar 20 estudios originales publicados en revistas indexadas del 2000 al 2012 (Tabla II). De estos 20 estudios, trece han evaluado la abundancia de las proteínas de *BRCA1/2*, mediante ensayos de inmunohistoquímica (IHQ) para la determinación proteica^{74, 111, 112, 119, 121-123, 125, 128} y/o mediante RT-PCR para la detección de RNAm.^{75, 118, 121, 123, 124, 129} De este subgrupo de 13, existen ocho estudios que han correlacionado la expresión de *BRCA1* con el resultado clínico de las pacientes.^{111, 112, 118, 121-124, 128} En cinco diferentes estudios, se demuestra que el aumento en la sobrevida global se encuentra asociado con una disminución o ausencia de la proteína de *BRCA1*^{112, 121-123, 128} y con una reducción en la expresión de RNAm de *BRCA1* en dos estudios.^{118, 124} Por el contrario, Wang y cols, no se lograron demostrar una asociación entre la abundancia de la proteína *BRCA1* y el pronóstico de las pacientes¹¹¹ utilizando ensayos de PCR y/o IHQ, en tumores grado 1 y estadio I. Sin embargo, en el estudio de Wang entre los 29 casos con estadio III y IV, se demostró una tendencia de sobrevivencia prolongada con la pérdida de la proteína de *BRCA1*.

Todos los estudios que evaluaron la correlación entre la disminución y/o ausencia de la proteína de *BRCA1*, en el cáncer esporádico epitelial de ovario, utilizando las técnicas de PCR y/o IHQ, excepto uno,¹¹¹ lograron demostrar un beneficio en la respuesta clínica de las pacientes.

De los 20 estudios publicados con respecto a la expresión de las proteínas *BRCA1/2* solamente 4 de ellos incluyeron el análisis de expresión de *BRCA2* en el carcinoma esporádico epitelial de ovario. Ninguno de ellos fue capaz de encontrar un vínculo entre la disminución/ausencia de la proteína *BRCA2* y la prevalencia del CEO o entre la disminución/ausencia de *BRCA2* y la sobrevida de las pacientes. Por el contrario, el estudio publicado por Chan et al¹²⁹ demostró una sobreexpresión estadísticamente significativa del RNAm de *BRCA2* en los especímenes tumorales. Entre las mujeres con cáncer ovárico seroso de alto grado, la mutación de *BRCA2*, mas no la mutación de *BRCA1*, ha sido asociada con una sobrevida prolongada, aumento en la respuesta de quimioterapia, e inestabilidad genómica comparada con el *BRCA* silvestre (wild-type).¹³⁰ Interesantemente, Bolton et al, encontraron un aumento en la sobrevivencia global a 5 años en pacientes portadoras de mutaciones *BRCA1* o *BRCA2*, mostrando un mejor pronóstico aquellas pacientes con mutaciones de *BRCA2*.¹³¹

Autor	Técnica de evaluación de BRCA	Pacientes con cáncer de ovario esporádico	BRCA1 bajo o ausente por IHQ	Metilación del promotor BRCA1	↓BRCA1 por técnica diferente	Efecto de ↓BRCA1 en la sobrevida
P. Russell ¹¹⁹	IHQ LOH RT-PCR	57	90%	N/A	44% LOH	N/A
M. Esteller ⁷⁵	LOH MSP-PCR RT-PCR	31	N/A	31%	31% LOH	N/A
R. Baldwin ⁷⁴	MSP-PCR LOH IHQ	81	15%	15%	N/A	N/A
D. Tong ¹³²	LOH	51	N/A	N/A	56% LOH	N/A
W. Zheng ¹²⁵	IHQ RT-PCR	38	34%	N/A	16% PCR	N/A
K. Chan ¹²⁹	LOH qRT-PCR	30	N/A	50%	LOH 40% PCR 67%	N/A
J. Hilton ⁷⁸	PTT MSP-PCR LOH	92	N/A	82%	N/A	N/A
C. Wang ¹¹¹	IHQ LOH PCR	76	72%	31%	N/A	No se encontró
C. Bozzetti ¹³³	LOH	23	N/A	N/A	35% LOH	N/A
H. Kato ¹²⁶	FISH	47	N/A	N/A	53% FISH	No se encontró
C. Wilcox ¹³⁴	MSP-PCR	50	N/A	16%	N/A	N/A
M. Thrall ¹²²	IHQ	230	65%	N/A	N/A	Aumento en SG
J. Quinn ¹¹⁸	qRT-PCR WB	70	N/A	N/A	67% ↓mRNA	Aumento en SG
E. Swisher ¹¹²	IHQ PCR	107	36%	13.5%	N/A	Aumento en SG
J. Weberpals ¹²⁴	RT-PCR WB	51	N/A	N/A	% no descrito ↓mRNA	Aumento en SG
J. Carser ¹²¹	IHQ qRT-PCR	292	41%	N/A	N/A	Aumento en SG
M. Radosa ¹²³	IHQ RT-PCR	27	44%	N/A	11% ↓mRNA	Aumento en SG
J. Weberpals ¹²⁸	IHQ	251	65%	N/A	N/A	Aumento en SG
M. Nikbakht ¹³⁵	MSP-PCR	60	N/A	13%	N/A	N/A
I. Ruscito ¹²⁷	PCR	127	N/A	14.2%	N/A	Pendiente resultado final

Tabla 5. Estudios publicados con enfoque en la reducción de la abundancia de la proteína de BRCA1 en el Cáncer Esporádico de Ovario.

Abreviaciones: ASCO, Sociedad Americana de Oncología Clínica; FISH, hibradación in situ fluorescente; IHQ, inmunohistoquímica; LOH, pérdida de heterocigosidad; Msp, específica de metilación; N/A, no aplica; PCR, reacción en cadena de la polimerasa; PTT, test de la proteína truncada; qRT, cuantitativo en tiempo real; SG, supervivencia global.

XIII CONCLUSIÓN

Estudios clínicos futuros deberá enfocarse en realizar esfuerzos continuos para seleccionar terapias blanco apropiadas basándose en la sub-etapificación del CMTN. Esfuerzos continuos para la recolección del tejido tumoral en pacientes que hayan sido llevadas a QT/NEO así como aquellas con presencia de enfermedad metastásica para una mejor comprensión de las vías relevantes que se asocian con la patogénesis del CMTN así como la resistencia terapéutica, y una estrategia de curación utilizando la combinación de inhibidores complementarios de las diferentes vías de crecimiento tumoral para maximizar la eficacia y minimizar la resistencia terapéutica.

Por otro lado el surgimiento de terapias diana y la medicina personalizada parecen ser un factor prometedor en la terapia de pacientes con cáncer de mama. Es necesario identificar aquellas pacientes que tendrán una mejor respuesta al tratamiento y a las que se les pueda brindar una mejor alternativa de manejo, por ejemplo: con inhibidores de PARP. Principalmente poco se conoce a cerca de los procesos epigenéticos responsables del patrón de BRCAness en CMTN; por lo cual, el estudio de los procesos epigenéticos podría contribuir en el entendimiento de la respuesta a tratamiento en los pacientes con dicho padecimiento.

La determinación del estatus de metilación de BRCA1 puede ser un factor predictivo importante de respuesta a la terapia con inhibidores del PARP. El estado de metilación, y por lo tanto funcional, de otros genes implicados en la vía de la recombinación homóloga puede ser igualmente relevante con respecto a la predicción de respuesta a la terapia con inhibidores del PARP.

XIV REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Perou CM. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012; **490**(7418): 61-70.
2. Rahman N, Stratton MR. The genetics of breast cancer susceptibility. *Annu Rev Genet*. 1998; **32**: 95-121.
3. Rhiem K, Todt U, Wappenschmidt B, Klein A, Wardelmann E, Schmutzler RK. Sporadic breast carcinomas with somatic BRCA1 gene deletions share genotype/phenotype features with familial breast carcinomas. *Anticancer Res*. 2010; **30**(9): 3445-9.
4. Chalasani P, Livingston R. Differential chemotherapeutic sensitivity for breast tumors with "BRCAness": a review. *Oncologist*. 2013; **18**(8): 909-16.
5. Turner N, Tutt A, Ashworth A. Hallmarks of 'BRCAness' in sporadic cancers. *Nat Rev Cancer*. 2004; **4**(10): 814-9.
6. Akashi-Tanaka S, Watanabe C, Takamaru T, Kuwayama T, Ikeda M, Ohyama H, et al. BRCAness Predicts Resistance to Taxane-Containing Regimens in Triple Negative Breast Cancer During Neoadjuvant Chemotherapy. *Clin Breast Cancer*. 2015; **15**(1): 80-5.

7. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015; **136**(5): E359-86.
8. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin*. 2015; **65**(1): 5-29.
9. Cárdenas J, Bargalló E, Aura E, Maafs E, Poitevin A. Consenso Mexicano sobre diagnóstico y tratamiento del cáncer mamario. Quinta Revisión ed: ELSEVIER; 2013.
10. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; **406**(6797): 747-52.
11. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001; **98**(19): 10869-74.
12. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*. 2007; **8**(5): R76.
13. Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009; **101**(10): 736-50.
14. Stevens KN, Vachon CM, Couch FJ. Genetic susceptibility to triple-negative breast cancer. *Cancer Res*. 2013; **73**(7): 2025-30.
15. Gradishar WJ, Anderson BO, Balassanian R, Blair SL, Burstein HJ, Cyr A, et al. Breast Cancer Version 2.2015. *J Natl Compr Canc Netw*. 2015; **13**(4): 448-75.
16. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Esterni B, Hermitte F, Viens P, et al. How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer*. 2008; **123**(1): 236-40.
17. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004; **10**(16): 5367-74.
18. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest*. 2011; **121**(7): 2750-67.
19. Cortazar P, Zhang L, Untch M, Mehta K, Costantino JP, Wolmark N, et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. *Lancet*. 2014; **384**(9938): 164-72.
20. von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2012; **30**(15): 1796-804.
21. Iwata H, Sato N, Masuda N, Nakamura S, Yamamoto N, Kuroi K, et al. Docetaxel followed by fluorouracil/epirubicin/cyclophosphamide as neoadjuvant chemotherapy for patients with primary breast cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 2011; **41**(7): 867-75.

22. Shien T, Yoshida M, Hojo T. Clinicopathologic features of primary breast cancer resisting primary systemic therapy. *Jpn J Breast Cancer*. 2008; **23**: 49-53.
23. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007; **13**(15 Pt 1): 4429-34.
24. von Minckwitz G, Schneeweiss A, Loibl S, Salat C, Denkert C, Rezai M, et al. Neoadjuvant carboplatin in patients with triple-negative and HER2-positive early breast cancer (GeparSixto; GBG 66): a randomised phase 2 trial. *The Lancet Oncology*. 2014; **15**(7): 747-56.
25. Sikov WM, Berry DA, Perou CM, Singh B, Cirrincione CT, Tolaney SM, et al. Impact of the Addition of Carboplatin and/or Bevacizumab to Neoadjuvant Once-per-Week Paclitaxel Followed by Dose-Dense Doxorubicin and Cyclophosphamide on Pathologic Complete Response Rates in Stage II to III Triple-Negative Breast Cancer: CALGB 40603 (Alliance). *J Clin Oncol*. 2015; **33**(1): 13-21.
26. Petrelli F, Coiu A, Borgonovo K, Cabiddu M, Ghilardi M, Lonati V, et al. The value of platinum agents as neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancers: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2014; **144**(2): 223-32.
27. Liu M, Mo QG, Wei CY, Qin QH, Huang Z, He J. Platinum-based chemotherapy in triple-negative breast cancer: A meta-analysis. *Oncol Lett*. 2013; **5**(3): 983-91.
28. Moore JK, Haber JE. Cell cycle and genetic requirements of two pathways of nonhomologous end-joining repair of double-strand breaks in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1996; **16**(5): 2164-73.
29. Vollebergh MA, Lips EH, Nederlof PM, Wessels LF, Schmidt MK, van Beers EH, et al. An aCGH classifier derived from BRCA1-mutated breast cancer and benefit of high-dose platinum-based chemotherapy in HER2-negative breast cancer patients. *Ann Oncol*. 2011; **22**(7): 1561-70.
30. Lee JM, Ledermann JA, Kohn EC. PARP Inhibitors for BRCA1/2 mutation-associated and BRCA-like malignancies. *Ann Oncol*. 2014; **25**(1): 32-40.
31. Oonk AM, van Rijn C, Smits MM, Mulder L, Laddach N, Savola SP, et al. Clinical correlates of 'BRCAness' in triple-negative breast cancer of patients receiving adjuvant chemotherapy. *Ann Oncol*. 2012; **23**(9): 2301-5.
32. Lips EH, Laddach N, Savola SP, Vollebergh MA, Oonk AM, Imholz AL, et al. Quantitative copy number analysis by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) of BRCA1-associated breast cancer regions identifies BRCAness. *Breast Cancer Res*. 2011; **13**(5): R107.
33. Rottenberg S, Nygren AO, Pajic M, van Leeuwen FW, van der Heijden I, van de Wetering K, et al. Selective induction of chemotherapy resistance of mammary tumors in a conditional mouse model for hereditary breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; **104**(29): 12117-22.
34. Kriege M, Jager A, Hoening MJ, Huijskens E, Blom J, van Deurzen CH, et al. The efficacy of taxane chemotherapy for metastatic breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Cancer*. 2012; **118**(4): 899-907.

35. Rummel S, Varner E, Shriver CD, Ellsworth RE. Evaluation of BRCA1 mutations in an unselected patient population with triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013; **137**(1): 119-25.
36. Lips EH, Mulder L, Oonk A, van der Kolk LE, Hogervorst FB, Imholz AL, et al. Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers. *Br J Cancer.* 2013; **108**(10): 2172-7.
37. Kassam F, Enright K, Dent R, Dranitsaris G, Myers J, Flynn C, et al. Survival outcomes for patients with metastatic triple-negative breast cancer: implications for clinical practice and trial design. *Clin Breast Cancer.* 2009; **9**(1): 29-33.
38. Masuda H, Baggerly KA, Wang Y, Zhang Y, Gonzalez-Angulo AM, Meric-Bernstam F, et al. Differential response to neoadjuvant chemotherapy among 7 triple-negative breast cancer molecular subtypes. *Clin Cancer Res.* 2013; **19**(19): 5533-40.
39. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2008; **26**(8): 1275-81.
40. Jones RL, Salter J, A'Hern R, Nerurkar A, Parton M, Reis-Filho JS, et al. The prognostic significance of Ki67 before and after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2009; **116**(1): 53-68.
41. Guarneri V, Piacentini F, Ficarra G, Frassoldati A, D'Amico R, Giovannelli S, et al. A prognostic model based on nodal status and Ki-67 predicts the risk of recurrence and death in breast cancer patients with residual disease after preoperative chemotherapy. *Ann Oncol.* 2009; **20**(7): 1193-8.
42. Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, Covington KR, Contreras A, Fuqua S, et al. Comprehensive Genomic Analysis Identifies Novel Subtypes and Targets of Triple-negative Breast Cancer. *Clin Cancer Res.* 2014.
43. Jezequel P, Loussouarn D, Guerin-Charbonnel C, Champion L, Vanier A, Gouraud W, et al. Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response. *Breast Cancer Res.* 2015; **17**: 43.
44. Rocca A, Viale G, Gelber RD, Bottiglieri L, Gelber S, Pruneri G, et al. Pathologic complete remission rate after cisplatin-based primary chemotherapy in breast cancer: correlation with p63 expression. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2008; **61**(6): 965-71.
45. Scully R, Ganesan S, Vlasakova K, Chen J, Socolovsky M, Livingston DM. Genetic analysis of BRCA1 function in a defined tumor cell line. *Mol Cell.* 1999; **4**(6): 1093-9.
46. Hereditary breast and ovarian cancer syndrome. *Gynecol Oncol.* 2009; **113**(1): 6-11.
47. Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science.* 1990; **250**(4988): 1684-9.
48. Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science.* 1994; **265**(5181): 2088-90.

49. Trainer AH, Lewis CR, Tucker K, Meiser B, Friedlander M, Ward RL. The role of BRCA mutation testing in determining breast cancer therapy. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010; **7**(12): 708-17.
50. Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science*. 1994; **266**(5182): 66-71.
51. Wooster R, Bignell G, Lancaster J, Swift S, Seal S, Mangion J, et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*. 1995; **378**(6559): 789-92.
52. Bertwistle D, Ashworth A. The pathology of familial breast cancer: How do the functions of BRCA1 and BRCA2 relate to breast tumour pathology? *Breast Cancer Res*. 1999; **1**(1): 41-7.
53. Chen JJ, Silver D, Cantor S, Livingston DM, Scully R. BRCA1, BRCA2, and Rad51 operate in a common DNA damage response pathway. *Cancer Res*. 1999; **59**(7 Suppl): 1752s-6s.
54. Clark SL, Rodriguez AM, Snyder RR, Hankins GD, Boehning D. Structure-Function Of The Tumor Suppressor BRCA1. *Comput Struct Biotechnol J*. 2012; **1**(1).
55. Powell SN, Kachnic LA. Roles of BRCA1 and BRCA2 in homologous recombination, DNA replication fidelity and the cellular response to ionizing radiation. *Oncogene*. 2003; **22**(37): 5784-91.
56. Tutt A, Ashworth A. The relationship between the roles of BRCA genes in DNA repair and cancer predisposition. *Trends Mol Med*. 2002; **8**(12): 571-6.
57. Yoshida K, Miki Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. *Cancer Sci*. 2004; **95**(11): 866-71.
58. Yu KD, Huang AJ, Fan L, Li WF, Shao ZM. Genetic variants in oxidative stress-related genes predict chemoresistance in primary breast cancer: a prospective observational study and validation. *Cancer Res*. 2012; **72**(2): 408-19.
59. Yu KD, Shao ZM. Initiation, evolution, phenotype and outcome of BRCA1 and BRCA2 mutation-associated breast cancer. *Nat Rev Cancer*. 2012; **12**(5): 372-3; author reply
60. Clark-Knowles KV, O'Brien AM, Weberpals JI. BRCA1 as a Therapeutic Target in Sporadic Epithelial Ovarian Cancer. *J Oncol*. 2010; **2010**: 891059.
61. Quinn JE, Carsen JE, James CR, Kennedy RD, Harkin DP. BRCA1 and implications for response to chemotherapy in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2009; **113**(1): 134-42.
62. Venkitaraman AR. Tumour suppressor mechanisms in the control of chromosome stability: insights from BRCA2. *Mol Cells*. 2014; **37**(2): 95-9.
63. Xia B, Sheng Q, Nakanishi K, Ohashi A, Wu J, Christ N, et al. Control of BRCA2 cellular and clinical functions by a nuclear partner, PALB2. *Mol Cell*. 2006; **22**(6): 719-29.
64. Buisson R, Dion-Cote AM, Coulombe Y, Launay H, Cai H, Stasiak AZ, et al. Cooperation of breast cancer proteins PALB2 and piccolo BRCA2 in stimulating homologous recombination. *Nat Struct Mol Biol*. 2010; **17**(10): 1247-54.

65. Ouchi T, Monteiro AN, August A, Aaronson SA, Hanafusa H. BRCA1 regulates p53-dependent gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998; **95**(5): 2302-6.
66. Miyoshi Y, Iwao K, Takahashi Y, Egawa C, Noguchi S. Acceleration of chromosomal instability by loss of BRCA1 expression and p53 abnormality in sporadic breast cancers. *Cancer Lett*. 2000; **159**(2): 211-6.
67. Narod SA. BRCA mutations in the management of breast cancer: the state of the art. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010; **7**(12): 702-7.
68. Lehmann BD, Pietenpol JA. Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes. *J Pathol*. 2014; **232**(2): 142-50.
69. Core. BCI. <http://research.nhgri.nih.gov/bic/>.
70. Sanz DJ, Acedo A, Infante M, Duran M, Perez-Cabornero L, Esteban-Cardenosa E, et al. A high proportion of DNA variants of BRCA1 and BRCA2 is associated with aberrant splicing in breast/ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2010; **16**(6): 1957-67.
71. Mangold KA, Wang V, Weissman SM, Rubinstein WS, Kaul KL. Detection of BRCA1 and BRCA2 Ashkenazi Jewish founder mutations in formalin-fixed paraffin-embedded tissues using conventional PCR and heteroduplex/amplicon size differences. *J Mol Diagn*. 2010; **12**(1): 20-6.
72. Ford D, Easton DF, Bishop DT, Narod SA, Goldgar DE. Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet*. 1994; **343**(8899): 692-5.
73. Foster KA, Harrington P, Kerr J, Russell P, DiCioccio RA, Scott IV, et al. Somatic and germline mutations of the BRCA2 gene in sporadic ovarian cancer. *Cancer Res*. 1996; **56**(16): 3622-5.
74. Baldwin RL, Nemeth E, Tran H, Shvartsman H, Cass I, Narod S, et al. BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: a population-based study. *Cancer Res*. 2000; **60**(19): 5329-33.
75. Esteller M, Silva JM, Dominguez G, Bonilla F, Matias-Guiu X, Lerma E, et al. Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors. *J Natl Cancer Inst*. 2000; **92**(7): 564-9.
76. Geisler JP, Hatterman-Zogg MA, Rathe JA, Buller RE. Frequency of BRCA1 dysfunction in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2002; **94**(1): 61-7.
77. Hennessy BT, Timms KM, Carey MS, Gutin A, Meyer LA, Flake DD, 2nd, et al. Somatic mutations in BRCA1 and BRCA2 could expand the number of patients that benefit from poly (ADP ribose) polymerase inhibitors in ovarian cancer. *J Clin Oncol*. 2010; **28**(22): 3570-6.
78. Hilton JL, Geisler JP, Rathe JA, Hattermann-Zogg MA, DeYoung B, Buller RE. Inactivation of BRCA1 and BRCA2 in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2002; **94**(18): 1396-406.
79. Tan DS, Rothermundt C, Thomas K, Bancroft E, Eeles R, Shanley S, et al. "BRCAness" syndrome in ovarian cancer: a case-control study describing the clinical features and outcome of patients with epithelial ovarian cancer associated with BRCA1 and BRCA2 mutations. *J Clin Oncol*. 2008; **26**(34): 5530-6.

80. Wysham WZ, Mhawech-Fauceglia P, Li H, Hays L, Syriac S, Skrepnik T, et al. BRCAness profile of sporadic ovarian cancer predicts disease recurrence. *PLoS One*. 2012; **7**(1): e30042.
81. Turner NC, Ashworth A. Biomarkers of PARP inhibitor sensitivity. *Breast Cancer Res Treat*. 2011; **127**(1): 283-6.
82. Rigakos G, Razis E. BRCAness: Finding the Achilles Heel in Ovarian Cancer. *Oncologist*. 2012; **17**(7): 956-62.
83. Berger SL, Kouyama M, Kim SY, Richon V, Schmitt AM, Shilatifard A, et al. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev*. 2009; **23**: 781-3.
84. Bell D, Birrer M, et al. Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*. 2011; **474**: 609–15.
85. Chiang JW, Karlan BY, Cass L, Baldwin RL. BRCA1 promoter methylation predicts adverse ovarian cancer prognosis. *Gynecol Oncol*. 2006; **101**(3): 403-10.
86. Doi A, Park IH, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, et al. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet*. 2009; **41**(12): 1350-3.
87. Motoyama N, Naka K. DNA damage tumor suppressor genes and genomic instability. *Curr Opin Genet Dev*. 2004; **14**(1): 11-6.
88. Paige AJ. Redefining tumour suppressor genes: exceptions to the two-hit hypothesis. *Cell Mol Life Sci*. 2003; **60**(10): 2147-63.
89. Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet*. 2009; **41**(2): 178-86.
90. Irizarry RA, Wu H, Feinberg AP. A species-generalized probabilistic model-based definition of CpG islands. *Mamm Genome*. 2009; **20**(9-10): 674-80.
91. Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Res*. 1996; **24**(24): 5064-6.
92. Taniguchi T, Tischkowitz M, Ameziane N, Hodgson SV, Mathew CG, Joenje H, et al. Disruption of the Fanconi anemia-BRCA pathway in cisplatin-sensitive ovarian tumors. *Nat Med*. 2003; **9**(5): 568-74.
93. Strathdee G, Appleton K, Illand M, Millan DW, Sargent J, Paul J, et al. Primary ovarian carcinomas display multiple methylator phenotypes involving known tumor suppressor genes. *Am J Pathol*. 2001; **158**(3): 1121-7.
94. Teodoridis JM, Hall J, Marsh S, Kannall HD, Smyth C, Curto J, et al. CpG island methylation of DNA damage response genes in advanced ovarian cancer. *Cancer Res*. 2005; **65**(19): 8961-7.
95. Thakur S, Croce CM. Positive regulation of the BRCA1 promoter. *J Biol Chem*. 1999; **274**(13): 8837-43.

96. Dobrovic A, Simpfendorfer D. Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res.* 1997; **57**(16): 3347-50.
97. Hsu NC, Huang YF, Yokoyama KK, Chu PY, Chen FM, Hou MF. Methylation of BRCA1 promoter region is associated with unfavorable prognosis in women with early-stage breast cancer. *PLoS One.* 2013; **8**(2): e56256.
98. Butcher DT, Mancini-DiNardo DN, Archer TK, Rodenhiser DI. DNA binding sites for putative methylation boundaries in the unmethylated region of the BRCA1 promoter. *Int J Cancer.* 2004; **111**(5): 669-78.
99. Butcher DT, Rodenhiser DI. Epigenetic inactivation of BRCA1 is associated with aberrant expression of CTCF and DNA methyltransferase (DNMT3B) in some sporadic breast tumours. *Eur J Cancer.* 2007; **43**(1): 210-9.
100. Davis PL, Miron A, Andersen LM, Iglehart JD, Marks JR. Isolation and initial characterization of the BRCA2 promoter. *Oncogene.* 1999; **18**(44): 6000-12.
101. Cucer N, Taheri S, Ok E, Ozkul Y. Methylation status of CpG islands at sites -59 to +96 in exon 1 of the BRCA2 gene varies in mammary tissue among women with sporadic breast cancer. *J Genet.* 2008; **87**(2): 155-8.
102. Bosviel R, Durif J, Guo J, Mebrek M, Kwiatkowski F, Bignon YJ, et al. BRCA2 promoter hypermethylation in sporadic breast cancer. *Omics.* 2012; **16**(12): 707-10.
103. Network CGAR. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature.* 2011; **474**(7353): 609-15.
104. Thompson ME, Jensen RA, Obermiller PS, Page DL, Holt JT. Decreased expression of BRCA1 accelerates growth and is often present during sporadic breast cancer progression. *Nat Genet.* 1995; **9**(4): 444-50.
105. Yang Q, Sakurai T, Mori I, Yoshimura G, Nakamura M, Nakamura Y, et al. Prognostic significance of BRCA1 expression in Japanese sporadic breast carcinomas. *Cancer.* 2001; **92**(1): 54-60.
106. Sourvinos G, Spandidos DA. Decreased BRCA1 expression levels may arrest the cell cycle through activation of p53 checkpoint in human sporadic breast tumors. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998; **245**(1): 75-80.
107. Xu CF, Chambers JA, Nicolai H, Brown MA, Hujeriat Y, Mohammed S, et al. Mutations and alternative splicing of the BRCA1 gene in UK breast/ovarian cancer families. *Genes Chromosomes Cancer.* 1997; **18**(2): 102-10.
108. Rice JC, Massey-Brown KS, Futscher BW. Aberrant methylation of the BRCA1 CpG island promoter is associated with decreased BRCA1 mRNA in sporadic breast cancer cells. *Oncogene.* 1998; **17**(14): 1807-12.
109. Scully R, Chen J, Ochs RL, Keegan K, Hoekstra M, Feunteun J, et al. Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell.* 1997; **90**(3): 425-35.

110. Pal T, Permuth-Wey J, Betts JA, Krischer JP, Fiorica J, Arango H, et al. BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer*. 2005; **104**(12): 2807-16.
111. Wang C, Horiuchi A, Imai T, Ohira S, Itoh K, Nikaido T, et al. Expression of BRCA1 protein in benign, borderline, and malignant epithelial ovarian neoplasms and its relationship to methylation and allelic loss of the BRCA1 gene. *J Pathol*. 2004; **202**(2): 215-23.
112. Swisher EM, Gonzalez RM, Taniguchi T, Garcia RL, Walsh T, Goff BA, et al. Methylation and protein expression of DNA repair genes: association with chemotherapy exposure and survival in sporadic ovarian and peritoneal carcinomas. *Mol Cancer*. 2009; **8**: 48.
113. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*. 2005; **434**(7035): 917-21.
114. Tutt AN, Lord CJ, McCabe N, Farmer H, Turner N, Martin NM, et al. Exploiting the DNA repair defect in BRCA mutant cells in the design of new therapeutic strategies for cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 2005; **70**: 139-48.
115. Rouleau M, Patel A, Hendzel MJ, Kaufmann SH, Poirier GG. PARP inhibition: PARP1 and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2010; **10**(4): 293-301.
116. Bryant HE, Schultz N, Thomas HD, Parker KM, Flower D, Lopez E, et al. Specific killing of BRCA2-deficient tumours with inhibitors of poly(ADP-ribose) polymerase. *Nature*. 2005; **434**(7035): 913-7.
117. Espejel S, Franco S, Rodriguez-Perales S, Bouffler SD, Cigudosa JC, Blasco MA. Mammalian Ku86 mediates chromosomal fusions and apoptosis caused by critically short telomeres. *Embo J*. 2002; **21**(9): 2207-19.
118. Quinn JE, James CR, Stewart GE, Mulligan JM, White P, Chang GK, et al. BRCA1 mRNA expression levels predict for overall survival in ovarian cancer after chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2007; **13**(24): 7413-20.

**A MI ESPOSA MARIA Y A MIS HIJOS MARIO Y SOFIA.
USTEDES SON LA MEJOR PARTE DE MI VIDA.
GRACIAS.**